



TITLE:

外洋海域における低栄養細菌の存在とその生存戦略(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

江口, 充

CITATION:

江口, 充. 外洋海域における低栄養細菌の存在とその生存戦略. 京都大学, 1990, 農学博士

ISSUE DATE:

1990-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r7300>

RIGHT:

新 制
農
580
京大附図

外洋海域における低栄養細菌 の存在とその生存戦略

江 口 充

1990

外洋海域における低栄養細菌 の存在とその生存戦略

江 口 充

1990

目 次

第 1 章 序 論	1
第 2 章 低栄養細菌計数法としての ^{14}C -MPN法	5
第 3 章 種々の海域における低栄養細菌の分布と基質利用特性	19
第 1 節 尾鷲湾, 熊野灘, 伊勢湾と高知沖海域	19
第 2 節 西太平洋と南シナ海	28
第 3 節 南極海	34
第 4 節 浦神湾と田辺湾	41
第 5 節 摘 要	46
第 4 章 種々の海域における有機物の代謝活性に関わる 低栄養細菌	48
第 5 章 低栄養細菌の生理的特性	67
第 1 節 分類学的特性	67
第 2 節 高濃度有機物, 低濃度有機物及び飢餓環境における 低栄養細菌の増殖特性	74
第 3 節 摘 要	99
第 6 章 総 括	101
Summary and conclusions	104
謝 辞	109
文 献	110

第1章 序 論

米国のC. E. ZoBell博士によって始められた海洋細菌の研究は、ZoBell 2216E培地 (Oppenheimer and ZoBell, 1952) とともに発展してきたといっても過言ではない。ただ、ZoBell 2216E培地の有機物濃度が、海洋の大半を占める外洋域の有機物濃度 (ca. 0.5 mgC/l) のほぼ10,000倍にも達する高濃度であるため疑問視する向きがないわけではなかった。たとえば、Sieburth (1967) や Fonden (1968) らは、ZoBell 2216E培地の5分の1や10分の1の有機物濃度の培地を用いて、より高い計数値が得られることを報告した。もっとも、それらの有機物濃度は、天然海水中の濃度より、まだ遙かに高いものであり、外洋域に存在する細菌群、特にその大部分を占める従属栄養細菌群に関する従来の研究は、いわゆる富栄養細菌群に限られ、真の外洋の海洋細菌については全く知見がなかったといえる。

外洋海水中的有機物濃度は、溶存態有機炭素量 (DOC, Dissolved Organic Carbon) で0.35~0.7 mgC/lと極めて希薄である (Menzel and Ryther, 1970)。しかもこのDOCの一部は無機態の懸濁粒子に吸着されたりしていて、実際に細菌群が利用可能なDOC (BDOC, Bioavailable DOC) 量は更に少ない。BDOCの推定値は、研究者により様々である。室内実験から算出した最も厳しい推定値では、DOCの6 %であり (Gordon and Millero, 1985)、現場での実験からはDOCの20~50 %と推定されている (Ishida et al., 1977; Servais et al., 1987 and 1989)。これらの推定値を考慮すると外洋海水中的BDOCは、20~350 μ gC/lということになる。

従来、このように有機物濃度が希薄な外洋水中の従属栄養細菌群は、その大部分が休眠状態 (dormancy) または飢餓状態 (starvation) で存在していて、増殖はしていないとされていた (Stevenson, 1978; Morita, 1985)。この休眠状態または飢餓状態の細菌が増殖するのは、有機懸濁物などの微視的に高濃度の有機物環境に遭遇したときであり (付着など)、その有機物を消費し尽くすと再びBDOCの希薄な外洋水中で飢餓状

態に入るとするのである (Wangersky, 1977). この考え方に基ずくと、外洋海水中で懸濁物に付着している従属栄養細菌は、全体のわずか0.1~4 %である (Alldredge et al., 1986) から、従属栄養細菌の95 %以上は休眠状態または飢餓状態で浮遊している細胞か、死滅した細胞ということになる。

外洋海水中の大部分の細菌が休眠状態または飢餓状態とする考え方が生まれた大きな要因のひとつは、ZoBell 2216E培地などの寒天平板培地による計数值 (生菌数) が、顕微鏡観察による計数值 (総菌数) の0.0001~0.1 %程度にしかならないことである。この総菌数と生菌数の差として、死滅した細胞、休眠細胞そして飢餓細胞の存在が強調された。しかし、ZoBell 2216E培地の有機物濃度 (数gC/l) は外洋海水中のBDOCの10,000倍以上の高濃度であり、外洋海水中で増殖している海洋細菌にとってこの濃度は極めて過酷な環境といえる。とすると、上記のZoBell 2216E培地には増殖できないが、外洋海水 (BDOCの最低濃度としてほぼ $20 \mu\text{gC} \cdot \text{l}^{-1}$) 程度の有機物濃度には増殖できる従属栄養細菌群が存在していても不思議ではない。この様な観点から、外洋において優勢な真の海洋細菌を検出するために、低栄養培地を用いた様々な細菌計数法が考案された。低栄養培地による培養計数法で一般的なのは、有機物を添加しない濾過海水のみで調製した寒天平板培地を用いるコロニー計数法である (Calucci and Shimp, 1974)。この方法は、Mallory et al. (1977) やYanagita et al. (1978) によっても用いられた。しかし、水生細菌の計数に固体の寒天培地を用いると、生息環境である液層から気-固層へと物理的環境の変化が著しいために、乾燥状態に弱いグラム陰性菌が主体をなす水生細菌の多くは増殖できず、計数值の減少が予想される。さらに、使用する寒天 (精製品) には多量の低分子量の炭水化物のほか、ニンヒドリン陽性物質として数10 mg/lが含まれているため、見かけ上有機物は無添加であっても、寒天培地を用いる以上、相当量の有機物が含まれることになる。

天然水中の細菌群集の計数に培養計数法を用いる場合、用いる培地の成分や培養条件によって選択圧がかかり、生きた細菌の全てを計数する

ことが出来ないことから、細菌群集の正常な姿を捉えられないとする否定的な意見もある。Brock (1987) は、寒天平板法では、固体表面での増殖能力の高い細胞ばかりが計数されたり、天然環境中で休眠状態であった細胞が寒天平板上でコロニーを形成する可能性があるなどの理由を挙げ、培養計数法は無意味であると断言している。しかし、生菌数は総菌数と異なり、環境水の有機栄養状態によく対応しており、環境水の状態や、細菌群の生理的な情報を知る上で有用であるとする研究者も多い (Van Es and Meyer-Reil, 1982; Delille and Bouvy, 1989)。すなわち、微生物生態学において、種々の細菌をひとまとめにして生物体量 (biomass) として扱う場合は、Brock (1987) の主張は当を得ている。しかし、一言で細菌といっても多種多様であり、それぞれが種々の役割 (niche) を持ち、環境の変化に対して様々な機能している。その機作を解明するためには、個々の細菌の機能を正しく把握しなければならない。従って、生きた細菌をできるだけ多く見いだす努力は重要であり、その手段として培養法は大きな意味を持つ。

近年では、マイクロオートラジオグラフィなどの顕微鏡観察による直接計数法の開発が進み、内湾域の海洋細菌の20~80 %は、活性を持つことが示されている (Tabor and Neihof, 1982)。また、DNAの前駆体である³H-チミジンの取り込み量から細菌の生産量を見積る方法も考案され、細菌群集の大半が増殖しているとする報告もある (Fuhrman and Azam, 1982)。ただ、活性細菌の大半は、呼吸は行っているが増殖はしていないという指摘もある (Morita, 1982)。いずれにしても、これら直接計数法では、細菌の増殖能力や生存能力 (viability)、栄養物に対する反応や、細菌群集の構成などの生理学的情報を得ることはできない。

Ishida and Kadota (1979) は、固体培地ではなく液体培地を用い、貧栄養湖水などと同程度の低栄養培地 (ca. 0.3 mgC/l) を用いた新しい培養計数法 (¹⁴C-MPN法) を考案し、従来の培養法の欠点を克服しようとした。この¹⁴C-MPN法の特徴は、従来の高栄養培地と低栄養培地を併用することで、有機物濃度に対する反応の違いから、水生の従属栄養細菌群を生理的に異なる2つのグループに分けて計数することを可能にした点で

ある。すなわち、従来の高栄養培地には増殖するが、低栄養培地には増殖できない富栄養細菌と、貧栄養湖水に相当する低栄養培地に増殖する低栄養細菌である。低栄養細菌は、さらに従来の高栄養培地に増殖できないものを偏性低栄養細菌、増殖できるものを通性低栄養細菌と暫定的に定義している。更に、 ^{14}C -MPN法を用いた場合、低栄養培地での細菌の増殖を確認するために添加するトレーサーレベルの ^{14}C -有機物の種類を変えることで、従属栄養細菌群の持つ基質利用特性を知ることができる。Ishida et al. (1980) は、 ^{14}C -MPN法を用いた琵琶湖北湖での調査から、貧栄養水域では従来の高栄養培地では捉えられない偏性低栄養細菌が優占することを明らかにした。

琵琶湖北湖などの貧栄養湖においては、低栄養細菌が優占することが明らかにされた。琵琶湖北湖での結果を考慮すると、湖水よりはるかに有機物の流入が少なく、人為的影響の少ない外洋域においては、当然、低栄養細菌が優占し、生態学的に重要な役割を担っていると推定できる。ところが、外洋海域の低栄養細菌の存在に関する知見は未だない。本研究は、外洋域における低栄養細菌の存在とその重要性を明らかにすることを目的とした。第1章の序論について、第2章では、琵琶湖北湖よりも更にBDOCが少なく低栄養状態と考えられる西太平洋、南シナ海、熊野灘海域、や南極海などの外洋海域を中心に、現場海水の ^{14}C -MPN法による細菌計数を行い、従来の高栄養培地による培養計数法との比較を行いながら、 ^{14}C -MPN法の有効性と低栄養細菌の重要性を明示した。第3章では、種々の海域における低栄養細菌の分布とその基質利用性について検討を加えた。第4章では、現場外洋海水の基質取り込み活性と低栄養細菌群との関係について考察し、物質循環に果たす低栄養細菌群の役割を明らかにした。第5章では、純粋分離した低栄養細菌を用いて、現場での ^{14}C -MPN法や基質取り込み活性測定実験から得られた外洋海水中的低栄養細菌群の持つ生理・生態学的特性を検証し、その生存戦略について考察を行った。

第2章 低栄養細菌計数法としての ^{14}C -MPN法

緒言

細菌の計数法には、大別して直接計数法と培養計数法がある。直接計数法により得られる細菌数（総菌数）に比べて、培養計数法により得られる細菌数（生菌数）が非常に少ないことは周知のことである。確かに、細菌群を生物体量（biomass）としてまとめて扱う場合、総菌数は価値ある情報を提供する。しかし、生態系において、どのような種類の細菌が、どのような機能を果たしているかなどの情報を、総菌数のみから得ることはできない。したがって、海洋生態系の細菌群の生理学的、生化学的情報を得るためには、各細菌を培養法により計数することが不可欠になる。

本研究では、貧栄養湖の低栄養細菌群を計数するために考案された ^{14}C -MPN法（Ishida and Kadota, 1979; Ishida et al., 1980）を海洋に適用して実験を行った。 ^{14}C -MPN法では、固体培地ではなく液体培地を用い、天然湖水と同程度の低濃度有機物培地を用いることで、従来の培養法の欠点を克服しようとしている。ここでは、有機物濃度が外洋水と同程度（ca. $0.3 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$ ）の海水培地を用いた ^{14}C -MPN法により、各種海域で従属栄養細菌を計数し、本法が外洋域の従属栄養細菌の計数法として有効であること、その主要なものが低栄養細菌によって占められていることを明らかにしようとした。

材料及び方法

計数用試料を採取した海域、採取時期、用いた培養計数法などは、次のとおりである。尚、培養計数法（ ^{14}C -MPN法、DC-MPN法、T-MPN法、寒天平板法）については後述する。

尾鷲湾（Stns. AとB、第3章第1節Fig. 3-1参照）：1982年4月（ ^{14}C -MPN法とT-MPN法）、1983年5月（ ^{14}C -MPN法とT-MPN法）、1984年4月（ ^{14}C -MPN法、T-MPN法、DC-MPN法、及び寒天平板法）。

熊野灘海域 (Stns. CとD, Fig. 3-1参照) : 1982年4月 (^{14}C -MPN法とT-MPN法), 1982年9月 (^{14}C -MPN法とT-MPN法), 1983年5月 (^{14}C -MPN法とT-MPN法), 1984年4月 (^{14}C -MPN法, T-MPN法, DC-MPN法, 及び寒天平板法).
高知沖: 1982年6月 (^{14}C -MPN法とT-MPN法).

西太平洋と南シナ海: 1981年10~11月 (^{14}C -MPN法, T-MPN法, 及び寒天平板法).

南極海: 1983年11月~1984年2月 (^{14}C -MPN法とT-MPN法).

浦神湾: 1985年11月 (DC-MPN法, T-MPN法及び寒天平板法), 1986年8月 (DC-MPN法, T-MPN法及び寒天平板法).

田辺湾: 1987年7月 (DC-MPN法, T-MPN法及び寒天平板法).

細菌の計数方法

海水試料中の従属栄養細菌の計数は ^{14}C -MPN法 (Ishida et al., 1980) とDC-MPN法により行った. 操作手順をFig. 2-1に示す. ^{14}C -MPN法とDC-MPN法は2種類の培地 (ST10 $^{-1}$ 培地とST10 $^{-4}$ 培地) を併用して細菌の計数を行う. ST10 $^{-4}$ 培地は1 lの熟成海水 (ASW, Aged Sea Water) に0.5 mgのカゼインペプトン (Trypticase, BBL社製) と0.05 mgの酵母エキス (Difco社製) を添加して調製する. ST10 $^{-1}$ 培地は1 lのASWにTrypticase (BBL) 0.5 gと0.05 gの酵母エキス (Difco) を添加して調製する. ST10 $^{-1}$ 培地は従来から用いられているZoBell 2216E培地の有機物濃度の約1/10程度の高濃度有機物培地であり, ST10 $^{-4}$ 培地の有機物濃度はST10 $^{-1}$ 培地の1/1000倍と薄く, 天然の外洋海水と同程度である.

ST10 $^{-1}$ 培地では細菌の増殖の有無を直接濁りにより確認する. ST10 $^{-4}$ 培地では培地中の有機物濃度が低いため細菌は濁るほど増殖しない. そこで, ^{14}C -MPN法では, ST10 $^{-4}$ 培地に極微量の ^{14}C -有機化合物を添加し (^{14}C -ST10 $^{-4}$ 培地), その取り込みにより細菌の増殖を確認する. 添加した ^{14}C -有機化合物の種類と比活性は次のとおりである: L-[^{14}C (U)]-グルタミン酸 (282.0 mCi \cdot mmol $^{-1}$), [^{14}C (U)]-グリシン (113.0 mCi \cdot mmol $^{-1}$), L-[^{14}C (U)]-ロイシン (337.1 mCi \cdot mmol $^{-1}$), L-[^{14}C (U)]-プロリン (268.1 mCi \cdot mmol $^{-1}$), [1,2- ^{14}C]-酢酸 (55.2 mCi \cdot mmol $^{-1}$),

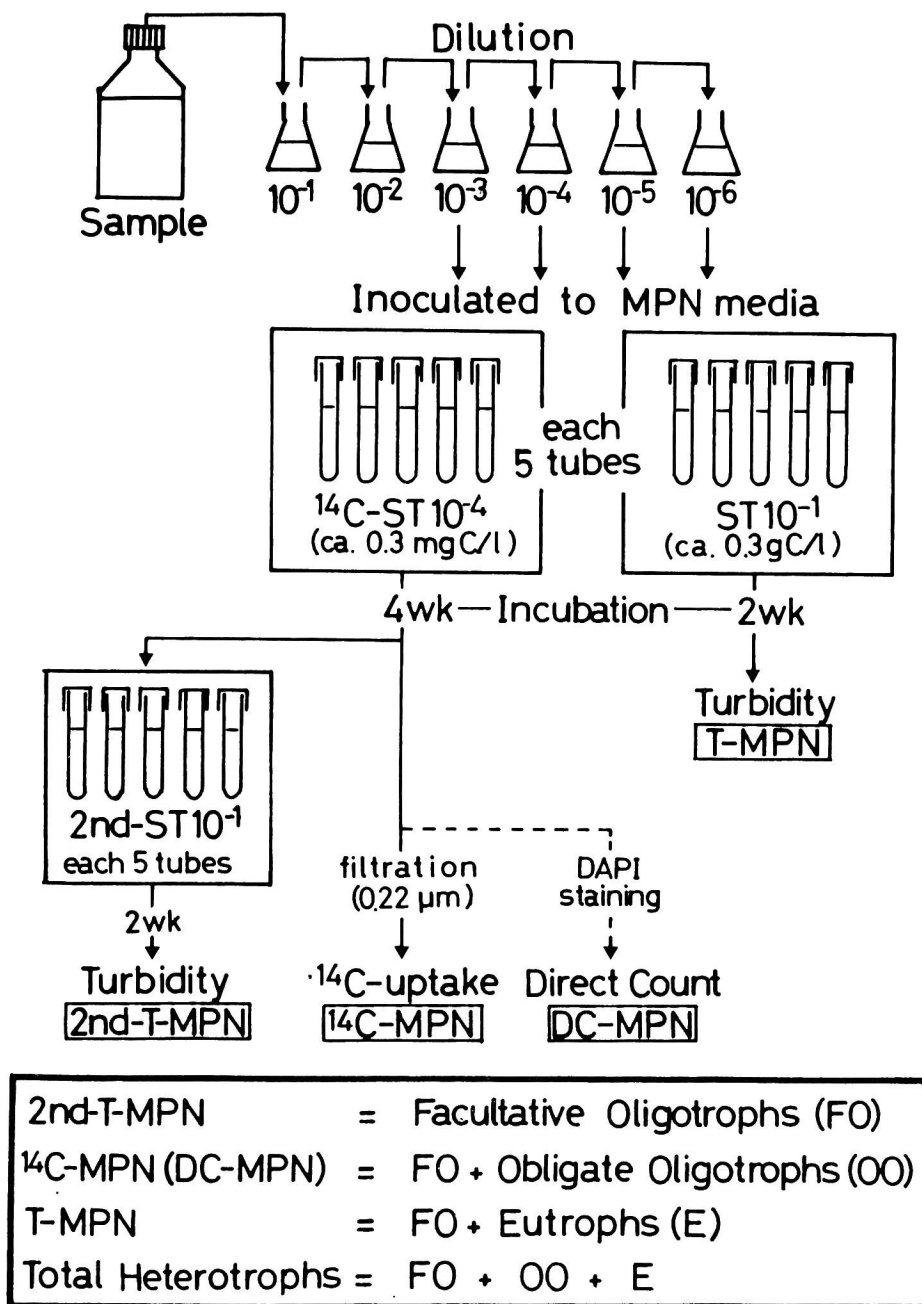


Fig. 2-1. Scheme of the procedure for the determination of bacterial number. Extinction dilution method (MPN, most probable number) with 5 replicate test tubes was employed.

D-[^{14}C (U)]-グルコース ($358.6 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$), [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-グリコール酸 ($8.8 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$). 各種 ^{14}C -有機化合物を 20 nCi ずつ各試験管 (ST 10^{-4} 培地 5 ml 入り) に添加し, オートクレーブ処理 (121°C , 15 min) して実験に使用した. DC-MPN法では, ST 10^{-4} 培地をそのままオートクレーブで滅菌して使用した.

使用した熟成海水 (ASW) は, 外洋海域 (水深 $30\sim 50 \text{ m}$) で採取した海水を GF/C ガラスフィルター (450°C , 1 h 燃焼済み, Whatman 社製) で濾過し, 十分に洗浄した 10 l のガラスボトルに入れ, 室温, 暗所で 1 ヶ月以上放置して調製した. 培地調製の際は, この熟成海水を孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター (Millipore 社製) で濾過して使用した.

各希釈段階の試料を接種した ST 10^{-1} 培地と ^{14}C -ST 10^{-4} 培地 (または ST 10^{-4} 培地) をそれぞれ 2 週間と 4 週間 20°C で培養後, 5 本立の最確数 (MPN, Most Probable Number) を算出した (Fig. 2-1). ^{14}C -ST 10^{-4} 培地 (または ST 10^{-4} 培地) 中での細菌増殖の検定に先立ち, 各試験管の培養液約 0.5 ml をそれぞれ新たに調製した ST 10^{-1} 培地に無菌的に 2 次接種した. この 2 次接種操作を行った後, ^{14}C -MPN法では, 各試験管の ^{14}C -ST 10^{-4} 培養液 (ca. 5 ml) をそれぞれ孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター上に流し込み, 培養液中の細菌をフィルター上に捕集した. このフィルターを滅菌人工海水約 5 ml で 3 回以上洗浄し, フィルターを赤外線ランプで直ちに乾燥した後, トルエン系液体シンチレーター (POPOP 0.1 g , DPO 4.0 g in toluene 1 l) 5 ml 含有のガラスバイアルに入れ, 液体シンチレーションカウンター (ALOKA LSC 502 または Packard Tri-CARB Model 2425) でフィルター上に捕集した放射線量 (dpm) を測定した. 最確数は, dpm 値が空試験値 (30 dpm) の 3 倍以上の試験管を陽性として算出した. DC-MPN法では, 培養液 (ca. 5 ml) を蛍光染色剤 (DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole) で染色し, $0.2 \mu\text{m}$ ヌクレオポアフィルターに濾過して, 落射型蛍光顕微鏡で観察し, 確認した (Poter and Feig, 1980). 培養液中の細菌数が $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上に達した試験管を陽性とした.

Fig. 2-1 に示すように, ST 10^{-4} 培地を用いて得られる計数値 (^{14}C -

MPNとDC-MPN)は“全低栄養細菌数(F0+00)”を示し、この培地の培養液を $ST10^{-1}$ 培地に2次接種して得られる計数值(2nd-T-MPN)は“通性低栄養細菌数(F0)”に相当する。試料水を希釈して直接 $ST10^{-1}$ 培地に接種して得られる計数值(T-MPN)は、“富栄養細菌(E)”と“通性低栄養細菌(F0)”を合計した計数值になる。従って、 ^{14}C -MPN値(またはDC-MPN値)から2nd-T-MPN値を差し引いた数が“偏性低栄養細菌(00)”の計数值になり、T-MPN値から2nd-T-MPN値を差し引いた数が“富栄養細菌(E)”数に相当する。“全従属栄養細菌(total heterotrophs)”数は“偏性低栄養細菌”、“通性低栄養細菌”、“富栄養細菌”を合計したものになる。

寒天平板培養法は、試料海水を滅菌したASWで適当に順次10倍希釈し、塗抹法により行った。各希釈段階で3枚ずつの寒天平板を使用した。用いた培地は、 $ST10^{-1}$ 培地に寒天(Bact Agar, Difco社製)を濃度が1.5 %になるように添加して調製した。培養は20℃で2週間行い、出現したコロニーを計数した。

直接計数用の試料は、採取後直ちに船上でグルタルアルデヒドを添加(最終濃度0.5~1 %)して固定し、DC-MPN法と同様の手順でDAPIで染色し、落射型蛍光顕微鏡で計数した。

結 果

1983年4月に熊野灘(Stn.D)と尾鷲湾(Stn.A)において行った有機物濃度の異なる3種類の液体培地を用いたMPN法の計数結果をTable 2-1に示した。 $ST10^0$ 培地は海洋細菌の計数に常用されるZoBell 2216E培地と同程度の有機物濃度(ca. $3gC \cdot l^{-1}$)であり、 $ST10^{-1}$ 培地はその1/10の有機物濃度、 ^{14}C - $ST10^{-4}$ 培地は1/10,000の有機物濃度である。Stn.Aでは計数值が $ST10^0 < ST10^{-1} = ^{14}C$ - $ST10^{-4}$ の順になり、Stn.Dでは $ST10^0 < ST10^{-1} < ^{14}C$ - $ST10^{-4}$ ($p=0.05$)となった。

1981年10~11月の西太平洋、南シナ海から1987年7月の田辺湾まで、高濃度有機物培地($ST10^{-1}$ 培地)と低濃度有機物培地($ST10^{-4}$ 培地)を併

Table 2-1. Bacterial numbers(ml^{-1}) counted by using liquid media containing organic nutrients in different concentrations at Stn. A (Owase Bay) and Stn. D (Kumano-nada Sea) in April 1983.

Stn.	Media		
	ST10 ⁰ (ca. 3 $\text{gC} \cdot \text{l}^{-1}$)	ST10 ⁻¹ (ca. 0.3 $\text{gC} \cdot \text{l}^{-1}$)	¹⁴ C-ST10 ⁻⁴ (ca. 0.0003 $\text{gC} \cdot \text{l}^{-1}$)
A	7.9×10^4	5.4×10^5	5.4×10^5
D	4.9×10^2	2.2×10^3	5.4×10^4

用して行ったすべての培養計数実験の結果をFig. 2-2にまとめた。Fig. 2-2aは有機物濃度が高い (ca. $300\text{mgC} \cdot \text{l}^{-1}$) 固体培地 (寒天平板法, PC値) と液体培地 (T-MPN法) を用いて同一試料の計数を行った場合の関係を示したグラフである。PC値とT-MPN値は高い正の相関 ($r=0.96$) を示し, $Y=0.92X-0.49$ の一次回帰直線を得た。例えば, $X=2$ ($=\text{T-MPN値}=10^2 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) のとき, $Y=1.35$ ($=\text{PC値} \approx 10^1 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) となり, 寒天平板法による計数値が液体培地を用いたT-MPN法の計数値より1桁ほど低くなる。 $X=5$ ($=10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) の場合, $Y=4.11$ ($\approx 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) になり, 細菌数が多い海域でも, 寒天平板法による計数値がT-MPN法による計数値よりも1桁近く低いことを示す。

Fig. 2-2bには同じ液体培地でも, 高濃度有機物培地を用いた場合 (T-MPN法) と外洋海水と同程度の低濃度有機物培地を用いた場合 (¹⁴C-MPN法とDC-MPN法) の関係を示した。Fig. 2-2a と同様にT-MPN値と¹⁴C-MPN値 (DC-MPN値も含む) の間にも高い正の相関 ($r=0.91$) を認め, $Y=0.67X+1.63$ の直線式に回帰した。 $X=2$ ($=\text{T-MPN値}=10^2 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) のとき, $Y=2.97$ ($=^{14}\text{C-MPN値} \approx 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) となり, ¹⁴C-MPN値がT-MPN値より1桁高くなった。しかし, $X=5$ のとき, $Y=4.98$ とほぼ等しくなり, 細菌数が多い海域では, T-MPN値と¹⁴C-MPN値 (DC-MPN値) に有為な差は生じないことを確認した。

次に, ¹⁴C-MPN法の全低栄養細菌計数の適性について調べた。低濃度有

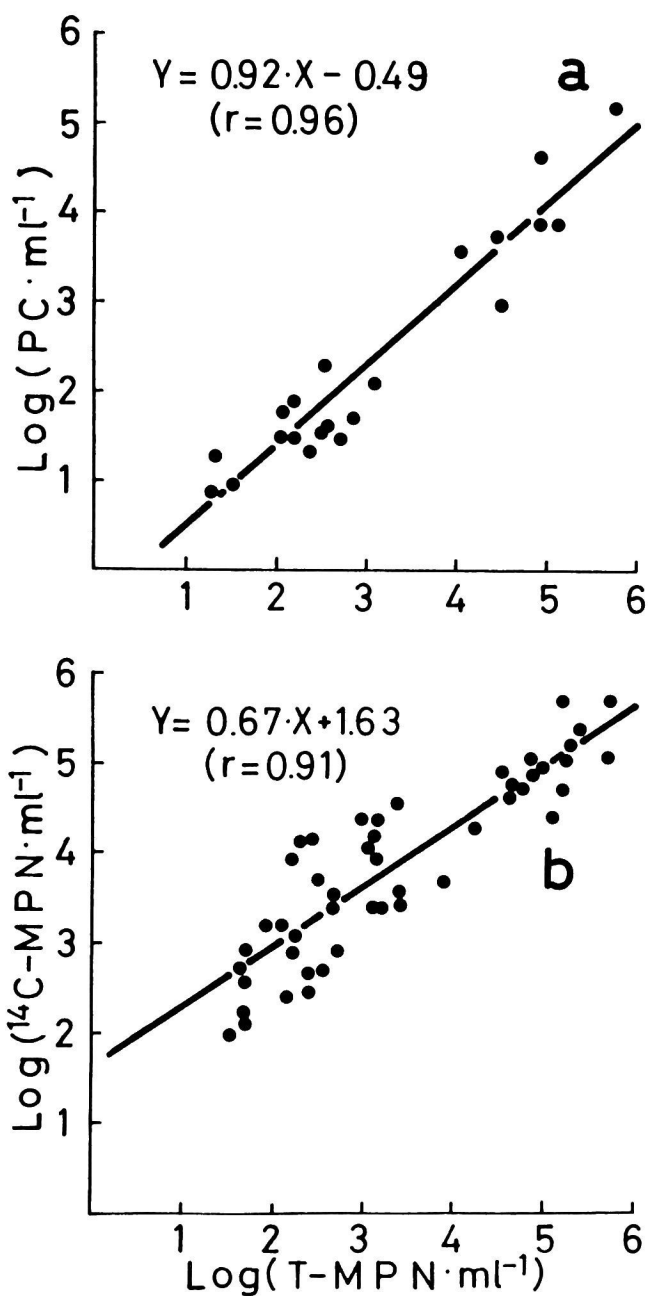


Fig. 2-2. Log-log plots of plate counts (PC) vs. T-MPN (a), and ¹⁴C-MPN vs. T-MPN (b). See the text for three counting methods employed to enumerate the viable bacteria. r, correlation coefficient.

機物培地（ST10⁻⁴培地）では、濁りが生じないのでトレーサーレベルの¹⁴C-有機物を培地に添加することで、細菌の増殖を確認する。その際、添加する¹⁴C-基質の種類を変えることで、各基質毎に利用する細菌数を得ることができる。しかし、低濃度有機物培地に増殖できる全低栄養細菌の数を求める場合、どの¹⁴C-基質が全低栄養細菌の計数に優れているかが問題になる。そこで1984年の熊野灘と尾鷲湾の実験では、試水を接種した¹⁴C-MPN法の各試験管の培養液（ca. 5ml）の半量を0.22 μ mミリポアフィルターに濾過して¹⁴C-MPN値算出に使い、残りの半量をDAPIで染色後、0.2 μ mヌクレオポアフィルターに濾過して直接計数を行い、DC-MPN値の算出に使った。実験に使用したすべての¹⁴C-有機物（¹⁴C-酢酸、

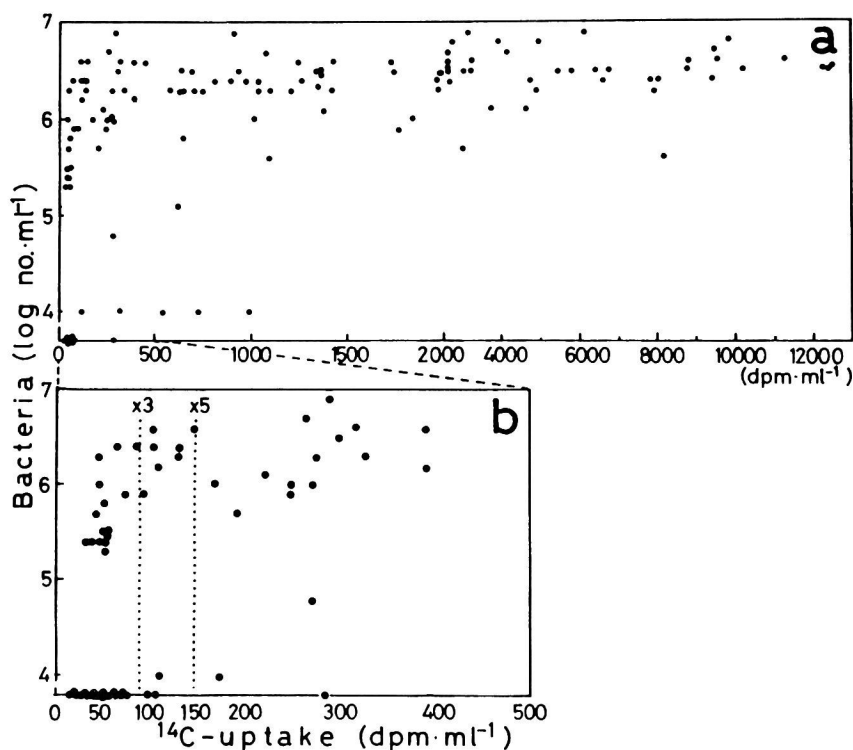


Fig. 2-3. Relationship between ¹⁴C-uptake count and direct bacterial count in test tubes of ¹⁴C-MPN method. The part of the Fig.2-3a(0~500 dpm) is enlarged in Fig. 2-3b. The two dotted lines (×3 and ×5) show dpm values of 3 and 5 times higher than the blank (30 dpm), respectively.

^{14}C -グルタミン酸, ^{14}C -グルコース, ^{14}C -グリシン, ^{14}C -グリコール酸, ^{14}C -タンパク加水分解物)のすべての希釈段階の試験管の培養液について ^{14}C -有機物の取り込み量($\text{dpm} \cdot \text{ml}^{-1}$)と総菌数を算出し, 縦軸に総菌数($\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$), 横軸に1ml当りのdpm値をとりプロットしたのがFig. 2-3である. Fig. 2-3a はすべての培養試験管の値を示し, Fig. 2-3b はdpm値が0~500の範囲を拡大して表したものである. Fig. 2-3b で $\times 3$ 及び $\times 5$ は ^{14}C -MPN値の算出に際して, 各試験管の陽性と陰性を判定する基準値を示し, $\times 3$ は空試験値の3倍, $\times 5$ は空試験値の5倍の値を示す. 尚, 本研究では空試験値の3倍を越えたものを陽性と判定した. DC-MPN法の場合は, 試験管中の総菌数が $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上のものを陽性と判定した. その根拠は, 細菌細胞当りの有機炭素量を $1.0 \sim 5.6 \times 10^{-13} \text{ gC} \cdot \text{cell}^{-1}$ (Bratbak, 1985) とすると, 低濃度有機物培地中の有機物約 $0.3 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$ を, 呼吸消費を無視して, 完全に細胞構成物として利用し尽くしたとしたら, 到達する細胞収量が $10^5 \sim 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であることによる.

1984年4月に熊野灘 (Stn.D) で水深別に行った, 各種培養計数法及び直接計数法の計数結果をFig. 2-4に示した. ここでの ^{14}C -MPN値は ^{14}C -タンパク加水分解物を用いた場合の計数値である. 直接計数法による計数値は, 表層海水で最も多く ($1.4 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$), 水深と共に徐々に減少するものの, 水深2,000 mでも $2.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり, 大きな変化はなかった. 培養計数法の計数値は直接計数法より, 高濃度有機物培地を用いたT-MPN値で2~3桁, 外洋海水と同程度の低濃度有機物培地を用いた ^{14}C -MPN値, DC-MPN値で1~2桁低くなった. しかし, 直接計数法による計数値と異なり, 水深にともない様々な変化を見せた. 表層 (0.5 m) 及び75~1,000 m層は, DC-MPN= ^{14}C -MPNとなり, 全低栄養細菌がタンパク加水分解物を利用したが, 10 m層や2,000 m層ではDC-MPN> ^{14}C -MPNになり, 低栄養細菌はタンパク加水分解物をあまり利用しなかった. また, T-MPNとの比較から, 表層 (0.5 m), 10 m層そして2,000 m層は, 偏性低栄養細菌が優占した.

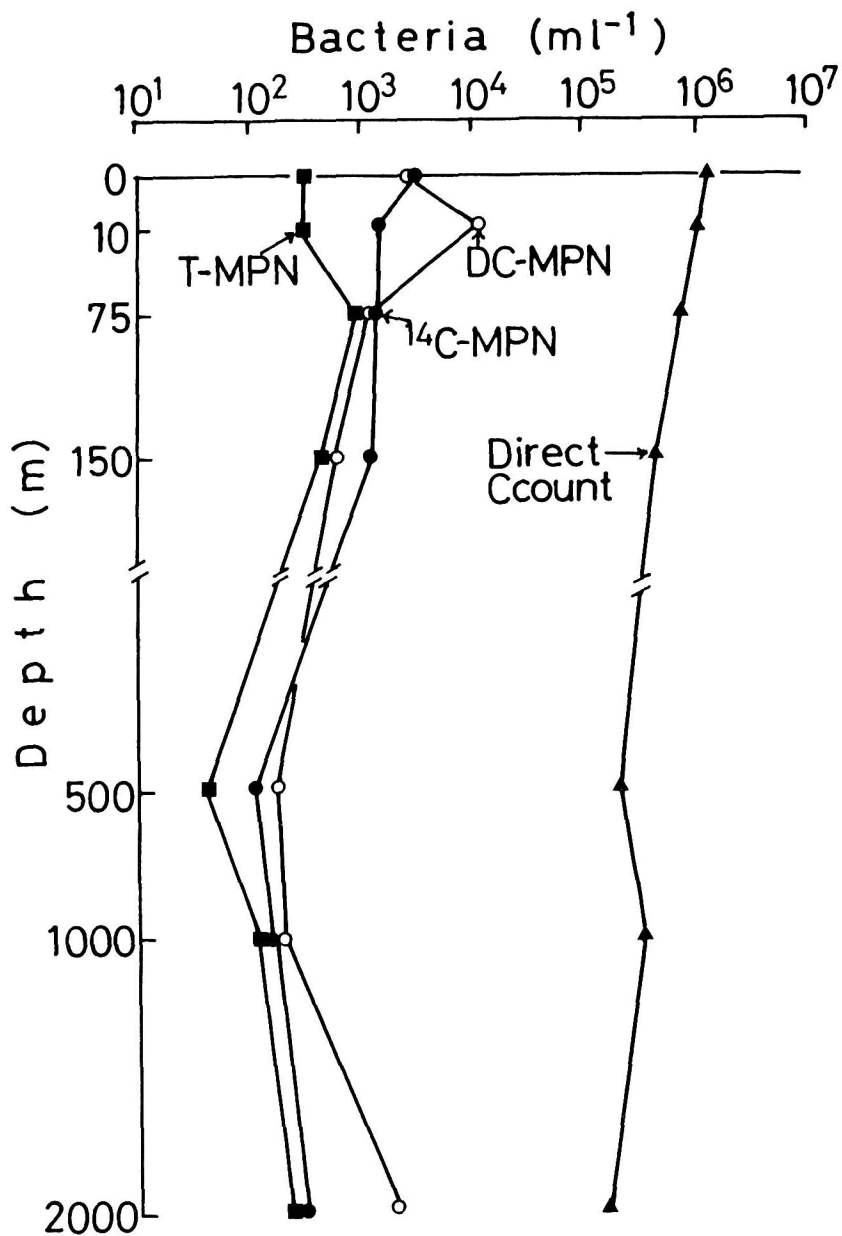


Fig. 2-4. Comparison of bacterial counts with different methods in the Kumano-nada Sea (Stn. D, April 1984). See the text for four kinds of counting methods.

考 察

海洋生態系における従属栄養細菌の研究は、総菌数や生物体量が明らかになる直接検鏡法（直接計数法）の開発だけでなく、生菌数の計数が可能な培養計数法に負うところが多い。細菌群の分類学的特性や生理学的側面を明らかにできる点で培養法は有効であるが、寒天平板法などに代表される培養法の致命的な欠点は総菌数のごく一部の細菌しか計数できない点である（Van Es and Meyer-Reil, 1982）。本章では、使用する培地の有機物濃度を外洋海水レベルに下げ、液体培地を用いることで、培養計数法の欠点を克服し、利点を生かそうとした ^{14}C -MPN法とDC-MPN法の有効性を従来の培養計数法と比較しながら検討した。

海洋細菌を培養法で計数する際、培地の物理的条件が計数値に大きく影響する。通常用いられている高濃度有機物培地を用いても、固体培地の場合（寒天平板法）と、液体培地の場合（MPN法）では、海域を問わず常に液体培地を用いた計数値の方が10倍ほど高くなる（Fig. 2-2a）。海水中を通常の生息域とする従属栄養細菌群にとって、寒天平板上は酸素分圧が高すぎたり、表面張力が大きすぎるといったことがその原因と考えられる（Van Es and Meyer-Reil, 1982）。

同じ液体培地によるMPN法でも、通常の高濃度有機物培地を用いた場合と、外洋海水と同程度の低濃度有機物培地を用いた場合では、液体培地と固体培地の比較（Fig. 2-2a）とはまた異なる様相を呈した（Fig. 2-2b）。外洋域のように海水中の従属栄養細菌の少ない（ $10^1 \sim 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）場合は、低濃度有機物培地を用いた計数値（ ^{14}C -MPN値）が高濃度有機物培地による計数値（T-MPN値）の10倍高い値を示したが、内湾域のように従属栄養細菌の多い（ $> 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）海域では ^{14}C -MPN値とT-MPN値に有意な差はなかった。直接計数法による総菌数と培養計数法による生菌数の間に大きな差が生ずる原因として様々なことが指摘されているが（Van Es and Meyer-Reil, 1982）、その中でも培地の有機物濃度は特に重要な点である。Fig. 2-2では培養法に用いる培地の有機物濃度の重要性を改めて明らかにし、有機物濃度の低い液体培地を用いる ^{14}C -

MPN法やDC-MPN法が海洋、特に外洋域の従属栄養細菌の計数に有効であることを確認した。

MPN法による計数を行う際に問題になるのは、各培養試験管中の細菌の増殖の有無を判定する基準である。 ^{14}C -MPN法では細菌の増殖の有無を極微量添加したトレーサーレベルの ^{14}C -有機物の細菌への取り込みにより判定する。本研究で陽性と判定した培養試験管 ($> 90 \text{ dpm} \cdot \text{ml}^{-1}$) の内、細菌数が $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上になっていたのは全体の95%以上に達した。従って、 ^{14}C -MPN法では試料中の細菌数を過大評価することはないと考える。dpm値が90未満の試験管 (112本) のうち、 $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上に細菌が増殖していたのは13%以上あり、高い頻度を示した。これは、培地に添加する ^{14}C -有機物の種類によるところが大きく、この特徴を応用して第3章で述べる従属栄養細菌群の持つ基質利用特性を知ることができる。

Table 2-2. Relationship between ^{14}C -uptake count ($\text{dpm} \cdot \text{ml}^{-1}$) and direct count ($\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) of each incubated tube for the ^{14}C -MPN method using ^{14}C -glycine and ^{14}C -glycolate at Stn. D (Kumano-nada Sea) in April 1984.

Substrate	Dilution rate of a seawater sample					
	10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}	
	^{14}C	DC	^{14}C	DC	^{14}C	DC
^{14}C -glycine	2894	6.8	272	6.0	29	0
	2629	6.8	53	4.0	35	0
	645	6.3	223	6.1	32	0
	921	6.5	131	6.4	42	0
	1316	6.5	2515	6.6	35	0
^{14}C -glycolate	45	6.0	43	6.3	48	0
	1236	6.6	45	0	34	0
	64	6.4	37	0	67	0
	970	6.4	43	0	53	0
	57	0	38	0	35	0

^{14}C , ^{14}C -uptake count ($\text{dpm} \cdot \text{ml}^{-1}$); DC, direct count ($\log \text{ no.} \cdot \text{ml}^{-1}$).

1984年4月の熊野灘 (Stn.D) で, ^{14}C -グリシンと ^{14}C -グリコール酸を使った場合の例をTable 2-2に示す. ^{14}C -グリシンでは, ラジオアイソトープの取り込みが陽性の試験管はすべて細菌数が $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上であり, ^{14}C -MPN値 = DC-MPN値 ($= 1.3 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) となる. 同じ試料の ^{14}C -グリコール酸の場合, DC-MPN値は $3.3 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり, ^{14}C -グリシンの ^{14}C -MPN値 (= DC-MPN値) と有意な差 ($p=0.05$) を認めなかった. ところが, ^{14}C -グリコール酸の ^{14}C -MPN値は $4.5 \times 10^2 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり, グリシンの ^{14}C -MPN値 (= DC-MPN値) や, グリコール酸のDC-MPN値より低くなった ($p=0.05$). これはTable 2-2に示したようにdpm値が陰性で細菌数が陽性になる, (dpm値, 細菌数) = (45, 1.0×10^6), (64, 2.8×10^6), (43, 1.9×10^6) といった試験管が出現するからである. 従って, ^{14}C -MPN法により熊野灘 (Stn.D) の表層海水中の従属栄養細菌群はグリコール酸よりもグリシンをよく利用するという生理学的な情報を得ることができる.

^{14}C -MPN法 (^{14}C -タンパク加水分解物使用), DC-MPN法, T-MPN法, 直接計数法 (DAPI染色) の細菌計数値の比較を行った (Fig. 2-4). 表層 (0.5 m) から2,000 m層まで直接計数値は $10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 前後で, 水深による大きな変化を示さなかったのに対して, 培養計数法による計数値は様々な変化を見せた. 表層水 (0.5 m) では, T-MPN値と ^{14}C -MPN値, DC-MPN値の間に有意な差 ($p=0.05$) を認めた. これは従属栄養細菌群に占める低栄養細菌, 特に偏性低栄養細菌の割合が高いことを示す. 基質利用性に関しては, ^{14}C -MPN値 = DC-MPN値となったことから, ほぼすべての従属栄養細菌群がタンパク加水分解物を利用したといえる. 10 m層では統計的に有意な差 ($p=0.05$) を持ってT-MPN値 $<$ ^{14}C -MPN値 $<$ DC-MPN値となった. ^{14}C -MPN値とDC-MPN値の違いは, 前述したように添加した ^{14}C -有機物の種類による. T-MPN値が低いのは, 0.5 m層と同様, 偏性低栄養細菌が優占しているためであろう. 75 m層から1,000 m層までは, 培養計数法の違いによる計数値の差 ($p=0.05$) はなかったが, T-MPN値が ^{14}C -MPN値やDC-MPN値より高くなることはなく, 低栄養細菌の中でも通性低栄養細菌の存在が大きいことを示す. 2,000 m層ではDC-MPN値がT-MPN値,

^{14}C -MPN値より有意な差 ($p=0.05$) を持って高くなり、偏性低栄養細菌が優占すると同時に、従属栄養細菌群の基質利用性が表層 (0.5 m) とは異なることを確認した。

この様に、低濃度有機物培地を用いた ^{14}C -MPN法は、従来の培養計数法では捉えられなかった、海洋で優占する低栄養細菌群の計数を可能にし、直接計数法では得られない、海水中に生息する従属栄養細菌群の様々な生理学的、分類学的情報を提供することが明らかになった。

摘 要

(1) 海洋細菌を計数する場合、同じ高栄養培地 (ca. 300 mgC/l) を用いても、液体培地 (MPN法) による計数値が、常に固体培地 (寒天平板法) による計数値より約10倍高くなった。

(2) 細菌数の多い ($\geq 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) 内湾水域では、液体の低栄養培地 (ca. 0.3 mgC/l) による計数値 (^{14}C -MPN値) と、高栄養培地による計数値 (T-MPN値) に差はなかった。ところが、外洋域 ($10^1 \sim 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) では、 ^{14}C -MPN値がT-MPN値よりも10倍高い値を示した。

(3) ^{14}C -MPN法とDC-MPN法による計数実験を同じ試料について行った結果、 ^{14}C -MPN法では使用するトレーサーレベルの ^{14}C -基質を変えることで、現場の細菌群の持つ基質利用特性を知ることが可能になることを明らかにした。

(4) 以上のことから、有機物濃度の低い液体培地を用いる ^{14}C -MPN法やDC-MPN法は、従来の培養計数法では捉えることのできなかった、外洋海水で優占する低栄養細菌群の計数を可能にし、その様々な生理学的、分類学的情報を提供することが明らかになった。

第3章 種々の海域における低栄養細菌の分布と基質利用特性

緒言

前章において、外洋域の従属栄養細菌を計数するために、低濃度有機物培地を用いる ^{14}C -MPN法（またはDC-MPN法）が有用であることを示した。本章では、内湾域の尾鷲湾、伊勢湾、浦神湾と田辺湾、外洋域の熊野灘、高知沖、西太平洋、南シナ海と南極海の各海域を対象として、 ^{14}C -MPN法（またはDC-MPN法）を用いて従属栄養細菌の計数をし、偏性低栄養細菌、通性低栄養細菌、と富栄養細菌の分布を調べた。さらに、それらの基質利用特性を明らかにしようとした。

第1節 尾鷲湾、熊野灘、伊勢湾と高知沖海域

材料および方法

試料の採取

尾鷲湾、熊野灘海域での海水試料の採取は、練習船勢水丸（三重大学所属）の次の4回の研究航海に乗船して行った：82-R-2次航海（1982年4月）、82-R-9次航海（1982年9月）、83-R-2次航海（1983年5月）、84-R-2次航海（1984年4月）。高知沖の黒潮安定暖水塊を中心にした海水試料の採取は、研究船白鳳丸（東京大学海洋研究所所属）のKH-82-3次航海（1982年6月）に乗船して行った。伊勢湾での採水は、調査船勢水丸（三重大学所属）に乗船して1981年7月に行った。

採水を行った尾鷲湾と熊野灘の測点をFig. 3-1に示す。表層海水（0.5m層）は、予め加熱処理（450℃, 1h）をして有機物の除去および滅菌を施した1,000 ml-ガラスボトル（Wheton社製）を用いて採取した。採取した海水試料はすべて実験に供するまでの間、船上で5℃に保った。 ^{14}C -MPN法による計数実験のための接種操作は、採水後30分以内に開始した。尾鷲湾と熊野灘海域の0.5 m層以深の採水はCTDロゼットサンプラー

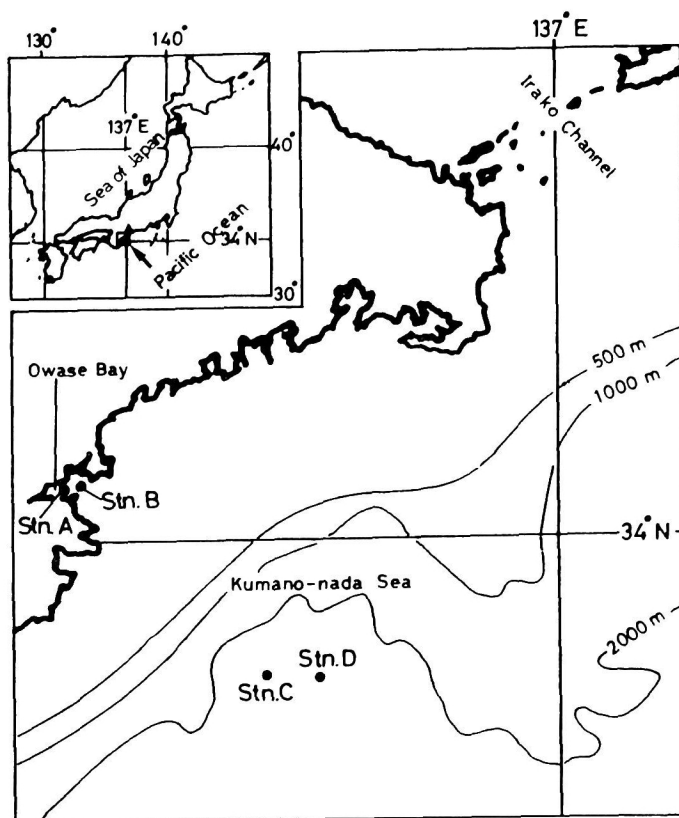


Fig. 3-1. Sampling locations in Owase Bay and the Kumano-nada Sea.

に装着したニスキン採水器で採取し、船上で上述の滅菌ガラスボトルに移した。高知沖の0.5 m層以深の採水は、“Butterfly”型バクテリアサンプラー（Niskin 社製）を用いて行った。

海水試料中の従属栄養細菌の計数は ^{14}C -MPN法とT-MPN法（第2章 材料及び方法 参照）により行った。

海水中の溶存態遊離アミノ酸（DFAA, Dissolved Free Amino Acids）の測定

1984年4月の尾鷲湾（Stn. A）、熊野灘（Stn. B）、高知沖（Stns. B1, C1とFM5-1）及び南極海域（Stns. 4, 5, 7）の表層海水（0.5 m層）中の溶存態遊離アミノ酸量の測定を行った。試水150 mlを燃焼済み（450

℃, 1 h) のガラスフィルター (GF/C, Whatman社製) で濾過し, 濾液を陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-8X, H⁺) に通して脱塩, 濃縮を行い, 回収した溶液を試料とした. この処理をした試料中の各種溶存態遊離アミノ酸量を, 自動アミノ酸分析計 (HITACHI 835-50 Amino Acid Analyzer) で測定した.

海水中の化学的酸素消費量 (COD) は, アルカリ性下でのKMnO₄の消費量から算出した (JIS K0101, 1979).

結 果

低栄養細菌の分布

尾鷲湾, 湾奥部 (Stn. A), 湾口部 (Stn. B) 及び熊野灘 (Stns. C, とD) における¹⁴C-ST10⁻⁴培地とST10⁻¹培地の2つの培地を併用したMPN法の計数結果をFig. 3-2に示した. 偏性低栄養細菌 (Obligate Oligotroph), 通性低栄養細菌 (Facultative Oligotroph) 及び富栄養細菌 (Eutroph) が全従属栄養細菌に占める割合もFig. 3-2に示した. Stn.Aはかなり有機汚濁の進行した水域であり, 全従属栄養細菌は常に10⁵ cells · ml⁻¹以上であった. 内湾域では, ¹⁴C-MPN値とT-MPN値の間に統計的に有意な差がなかった (p=0.05). 1982年と1983年の試料海水中のCOD値はそれぞれ1.56と2.68 (O₂mg · l⁻¹) であった. 1982年と1984年のStn.Aでは全従属栄養細菌のすべてを通性低栄養細菌が占めていた. 1983年のStn.Aは全従属栄養細菌の37%を富栄養細菌, 26%を通性低栄養細菌, 残る37%を偏性低栄養細菌が占めていた. 尾鷲湾の海水と熊野灘の外洋海水が混合すると考えられるStn.B (1983年) では, ¹⁴C-MPN値とT-MPN値に統計的に有為な差はなく, 富栄養細菌, 通性低栄養細菌, 偏性低栄養細菌がそれぞれ全従属栄養細菌の13, 47, 40%を占めた. 一方, 熊野灘海域 (Stns.C, D) の全従属栄養細菌数は, $9.2 \times 10^3 \sim 5.4 \times 10^4$ cells · ml⁻¹ (av. 2.2×10^4 cells · ml⁻¹) であり, Stns.AとBの細菌数に比べて1桁もしくは2桁低くなった. ¹⁴C-MPN値とT-MPN値の差も大きく, 全従属栄養細菌に占める偏性低栄養細菌の割合は, すべて85%以上であった. COD値

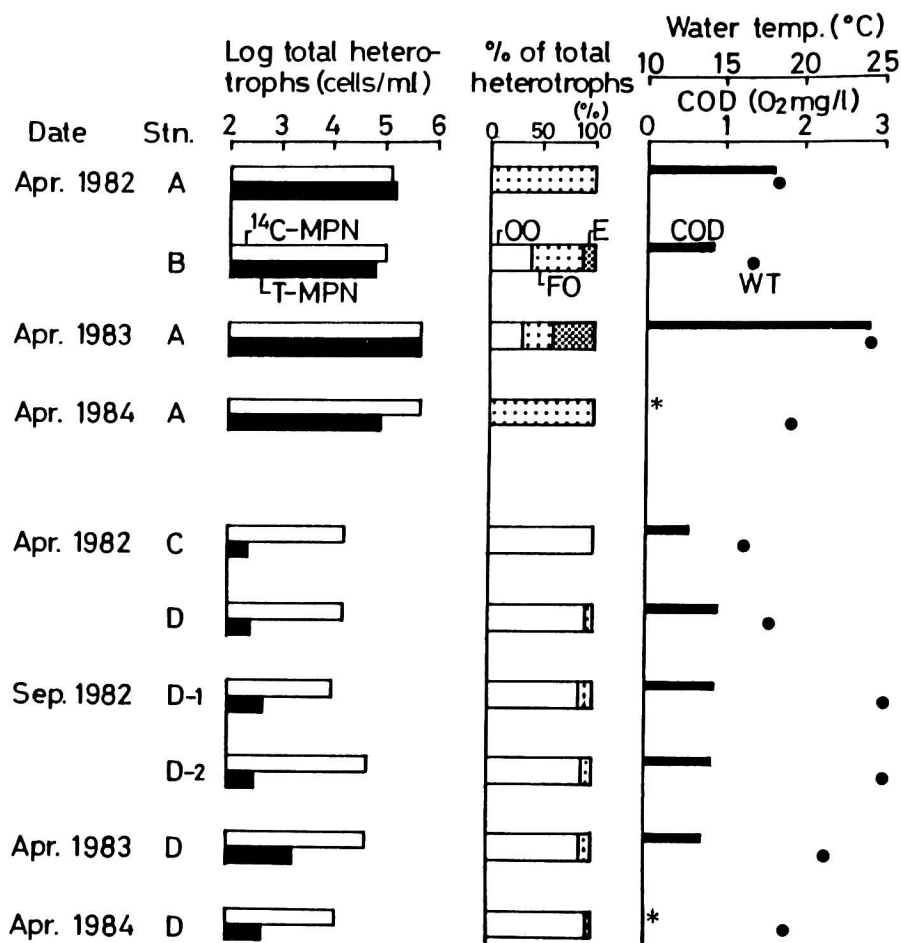


Fig. 3-2. Comparison of the number of total heterotrophs, the ratio of ¹⁴C-MPN to T-MPN, and the ratio of obligate oligotrophs, facultative oligotrophs and eutrophs to total heterotrophs in Owase Bay (Stns. A and B) and the Kumano-nada Sea (Stns. C and D). OO, obligate oligotrophs; FO, facultative oligotrophs; E, eutrophs; WT, water temperature; *, COD not measured.

も低く（常に1.0 O₂mg · ml⁻¹未満），富栄養細菌は全く検出されなかった。

同一測点の採水位置の違いによる計数結果の差異を調べるため，1982年9月のStn. Dでは練習船勢水丸の右舷側（Stn. D-1）と左舷側（Stn. D-2）から同時に採水を行った。Stn. D-1とStn. D-2の間には，Fig. 3-2に示す

ように、全従属栄養細菌数も偏性低栄養細菌の全従属栄養細菌に占める割合にも有意な差を認めなかった。

伊勢湾と高知沖の海域を中心に行ったMPN法による計数結果をFig. 3-3に示した。高知沖の表層（0.5 m）の8試料のうち、 ^{14}C -MPN値がT-MPN値より高くなった（ $p=0.05$ ）のは、5試料であった。いずれの測点においても富栄養細菌はまったく検出できず、従属栄養細菌群のすべてを低栄養細菌が占めていた。伊勢湾では、尾鷲湾と同様に、従属栄養細菌

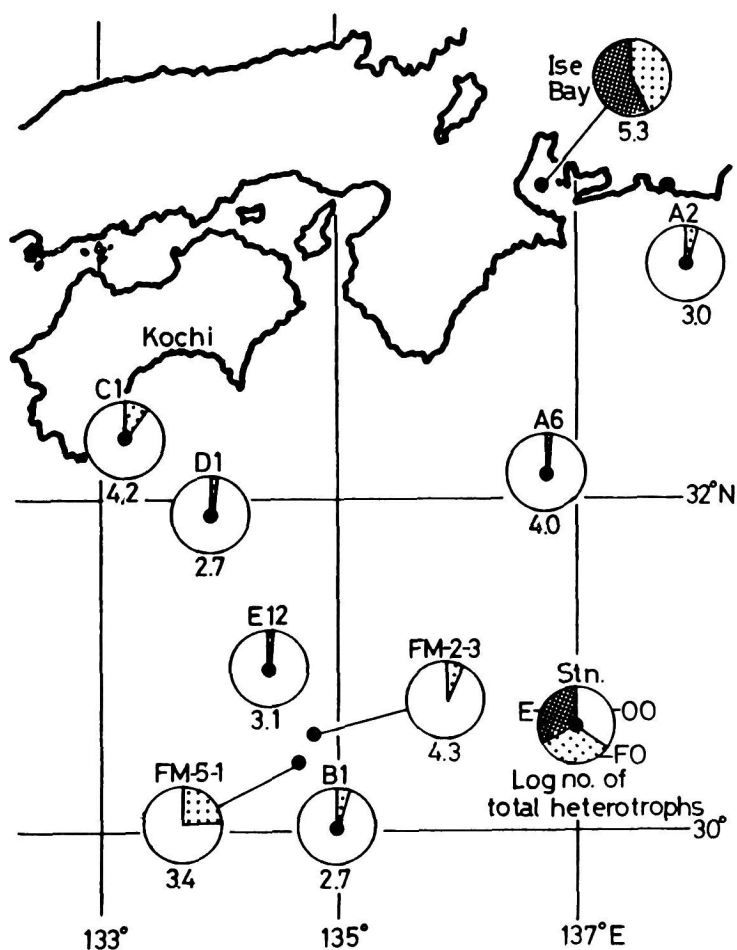


Fig. 3-3. Comparison of the number of total heterotrophs (log cells \cdot ml $^{-1}$), the ratio of OO, FO and E to total heterotrophs in Ise Bay and off Kochi. See legend to Fig. 3-2 for the details.

数は $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上になり、高知沖の試料などとは異なり、偏性低栄養細菌は殆ど検出できず、富栄養細菌と通性低栄養細菌が優占した。

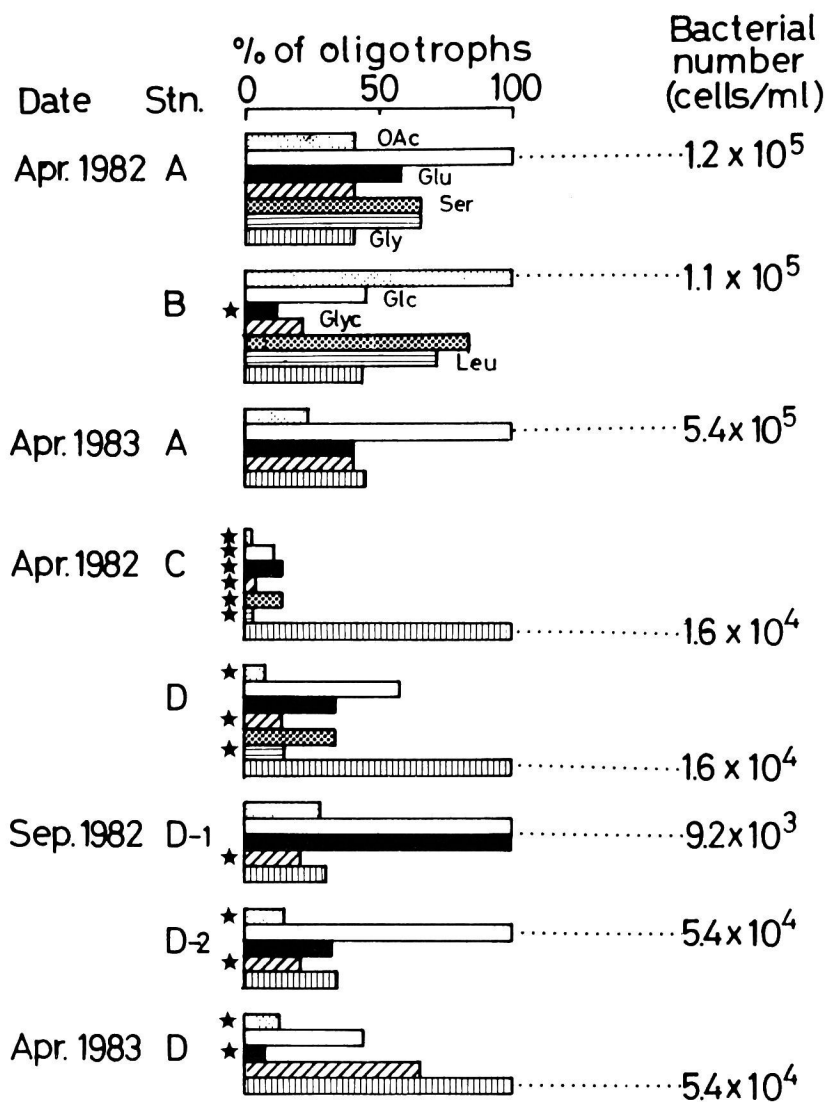


Fig. 3-4. The ratio of oligotrophs utilizing acetate (OAc), glucose (Glc), glutamate (Glu), glycolate (Glyc), serine (Ser), leucine (Leu), and glycine (Gly) in Owase Bay (Stns. C and D) and the Kumano-nada Sea (Stns. C and D). Bacterial numbers are the highest counts of each sample, and stars indicate the counts that are significantly lower ($p=0.05$) than the highest counts.

基質利用特性

尾鷲湾と熊野灘海域において、低栄養細菌群がどの有機物を最もよく利用するかをFig. 3-4に示した。すなわち、5または7種類の ^{14}C -有機物をトレーサーレベルでMPN用の低濃度培地に加え、各水域の細菌数を求めた。それぞれの ^{14}C -有機物を利用する低栄養細菌数のうち、最も高い計数値（Fig. 3-4中の計数値）を100とし、それに対する他の有機物を利用する細菌数の割合をパーセンテージで表した。内湾水（Stn. A）と外洋水（Stns. CとD）との間に明かに異なる傾向を認めた。Stn. Aでは各基質を利用する細菌数の間に差がなく（ $p=0.05$ ）、この水域の細菌群はどの基質もよく利用すると推定した。しかし、Stns. CとDでは各基質を利用する細菌数の間に有意差（ $p=0.05$ ）を認めた。Stn. Bの細菌群は内湾水（Stn. A）と外洋水（Stns. C, D）の中間的な傾向を示した。

4月の外洋水について行った実験では、使用した ^{14}C -有機物の内グリシンが常に最も高い計数値を示し、9月の外洋水は、 ^{14}C -グルコースを利用する低栄養細菌が優勢であった。外洋海域で行った5回の調査の内、4回までが ^{14}C -酢酸による計数値が低くなった。

高知沖の海域及び伊勢湾では、 ^{14}C -酢酸、 ^{14}C -グルコース、 ^{14}C -グルタミン酸、 ^{14}C -グリコール酸の4種類の ^{14}C -有機物について実験を行った（Fig. 3-5）。4種類の有機物による ^{14}C -MPN値の間に差を認めなかったのは、高知沖の場合、Stn. B1の表層（0.5 m）の試料のみで、他の海水試料では、グリコール酸利用細菌が優占した（8測点中6測点）。最も利用性が低かったのは酢酸であり、8試料のうち4試料で ^{14}C -酢酸の ^{14}C -MPN値が最も低くなった。伊勢湾（0.5 m層）では、いずれの基質もよく利用されていた。

考 察

ここでは、外洋の貧栄養水域と内湾の富栄養水域における従属栄養細菌群の量的及び質的（細菌数、有機物の利用性、有機物濃度に対する反応）違いを ^{14}C -MPN法により明かにした。熊野灘（Stn. C, Stn. D）などの

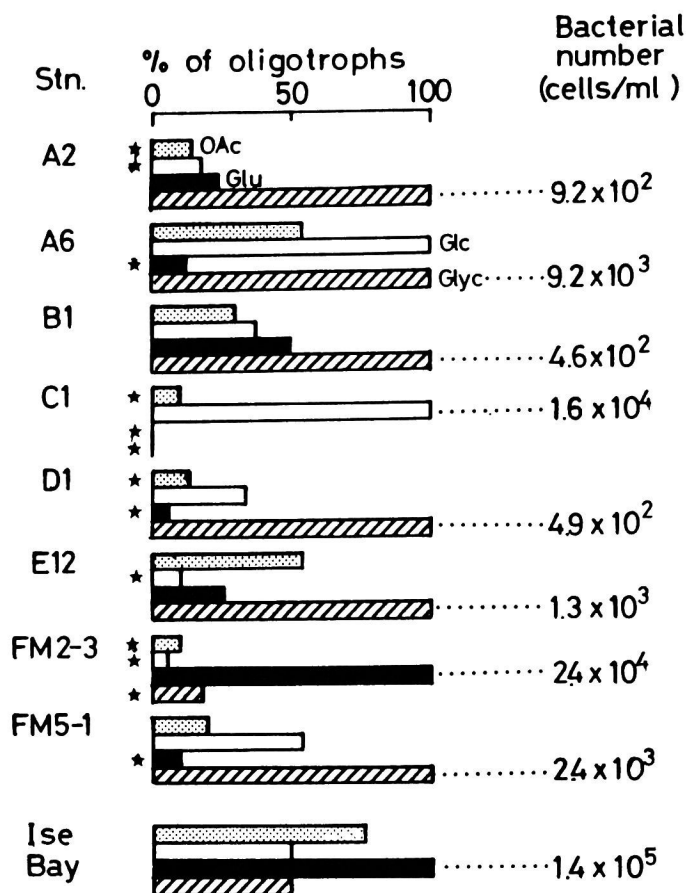


Fig. 3-5. The ratio of oligotrophs utilizing OAc, Glc, Glu and Glycin Ise Bay and off Kochi. See legend to Fig. 3-4 for the details.

外洋域では、 ^{14}C -ST 10^{-4} 培地を用いた計数值（ ^{14}C -MPN値）が、従来から用いられている高濃度有機物培地による計数值（T-MPN値）より常に1～2桁高くなった（Fig. 3-2）。外洋域で優占する細菌群は、低栄養細菌の中でも、とりわけ、低濃度の有機物培地（e.g. ^{14}C -ST 10^{-4} 培地）でのみ増殖する偏性低栄養細菌であった。同様の傾向は南シナ海、西太平洋域と南極海域の実験でも認めた（第3章第2項と3項参照）。

外洋である熊野灘海域（Stns. CとD）の低栄養細菌群は、酢酸よりアミノ酸、とくにグリシンをよく利用する傾向を持ち、尾鷲湾（Stns. AとB）や伊勢湾の従属栄養細菌群と比べると利用可能な基質の種類が少なかっ

た (Fig. 3-4, Fig. 3-5). 同様の傾向は高知沖の海域でも確認した (Fig. 3-5). 高知沖の実験では, 偏性低栄養細菌が優占すると酢酸の利用性が低くなり, 利用基質に対する特異性が高くなった. 琵琶湖北湖から純粋分離した偏性低栄養細菌もアミノ酸, 特にグリシン, グルタミン酸やセリンに対して高い基質利用性を示すことが知られている (Ishida and Kadota, 1981). 外洋域の低栄養細菌群の基質利用範囲が狭くなるという特徴は, Hirsch et al. (1979) が提唱した, “model oligotrophs” が多種類の基質を利用するという仮説とは異なる. 海水中の溶解態アミノ酸の分析結果などからも分かるように (Table 3-1, Lee and Table 3-1. Dissolved free amino acids in surface (0.5 m-depth) sea-waters ($\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

	Sampling locations							
	Owase Bay	Kumano-nada Sea	Off Kochi			Antarctic Ocean		
	A	D	B1	C1	FM5-1	4	5	7
Gly	100.3	57.7	36.7	29.2	23.6	32.9	24.4	33.8
Ser	63.5	34.5	30.4	37.1	14.5	27.8	30.0	16.0
Glu	73.6	19.4	5.1	7.3	8.0	14.4	12.8	23.0
Ala	59.3	19.2	15.0	15.2	10.9	18.3	18.2	22.0
Asp	32.4	14.8	10.3	8.6	1.8	9.9	7.5	13.2
Orn	19.6	11.4	5.4	2.6	3.0	21.5	7.8	5.3
Thr	20.9	6.2	5.7	8.1	2.3	5.6	7.8	4.1
Leu	10.9	5.2	5.6	4.1	5.3	5.5	3.4	3.5
Lys	10.1	4.7	-	-	-	8.0	2.6	8.4
Val	16.1	4.4	4.0	4.2	2.2	4.5	5.2	3.4
Tyr	5.2	4.1	4.9	1.9	1.7	5.0	2.2	2.2
Phe	5.3	3.3	4.1	0.8	3.0	3.6	1.6	2.2
His	3.4	2.8	6.7	3.5	2.1	4.5	0.8	1.6
Cys	6.3	2.0	-	-	-	1.9	1.7	2.9
Ile	8.8	1.6	3.7	2.8	2.4	2.5	2.8	1.2
Arg	0.4	0.0	-	-	-	4.5	4.7	0.1
Total	436.1	191.3	137.6	125.4	80.8	170.4	133.5	142.9

, no data.

Bada, 1975), 偏性低栄養細菌が優占する外洋域は, どの水域でも通常, グリシンが最も多く, ついでセリン, アラニン, グルタミン酸の順となっている. つまり, 有機物濃度が低いばかりでなく, その多様性も低く, 安定している. 従って, 低栄養細菌は必ずしも広い範囲の基質利用性を持つ必要がないのかもしれない. 海水中の溶存態アミノ酸に占めるグリシンとセリンの比率が高くなるのは, これら分子量の低いアミノ酸1モル当たりから得られるエネルギー量が分子量の高いアミノ酸と比べ少ないため, 従属栄養細菌群があまり利用しなくなるからではないかと考えられていた (Andrews and Williams, 1971). しかし, ここでの結果から, 外洋域の従属栄養細菌はむしろグリシンをよく利用することが明らかになった. グリシンとセリンの起源は明かではないが, 恐らく植物プランクトンの光合成の代謝産物であろう (横田ら, 1990).

第2節 西太平洋と南シナ海

材料及び方法

試料の採取

海水及び底泥試料の採取は, 研究船白鳳丸 (東京大学海洋研究所所属) のKH-81-5次研究航海 (1981年10~11月) に参加して行った.

試料を採取した測点をFig. 3-6に示す. 表層海水 (0.5 m 層) は熊野灘海域と同様に1,000-ml の滅菌ガラスボトルを用いて採取した. Stn. 11 とStn. 12 の100m 層以深の海水は “Butterfly” 型バクテリアサンプラー (Niskin 社製) を用いて採取し, 底泥試料はBox-corerで採取した.

細菌の計数方法

^{14}C -MPN法は第2章 (Fig. 2-1) で述べた手順と同様にして行った. ^{14}C -MPN法に使用した ^{14}C -有機物の種類は ^{14}C -酢酸, ^{14}C -グルコース,

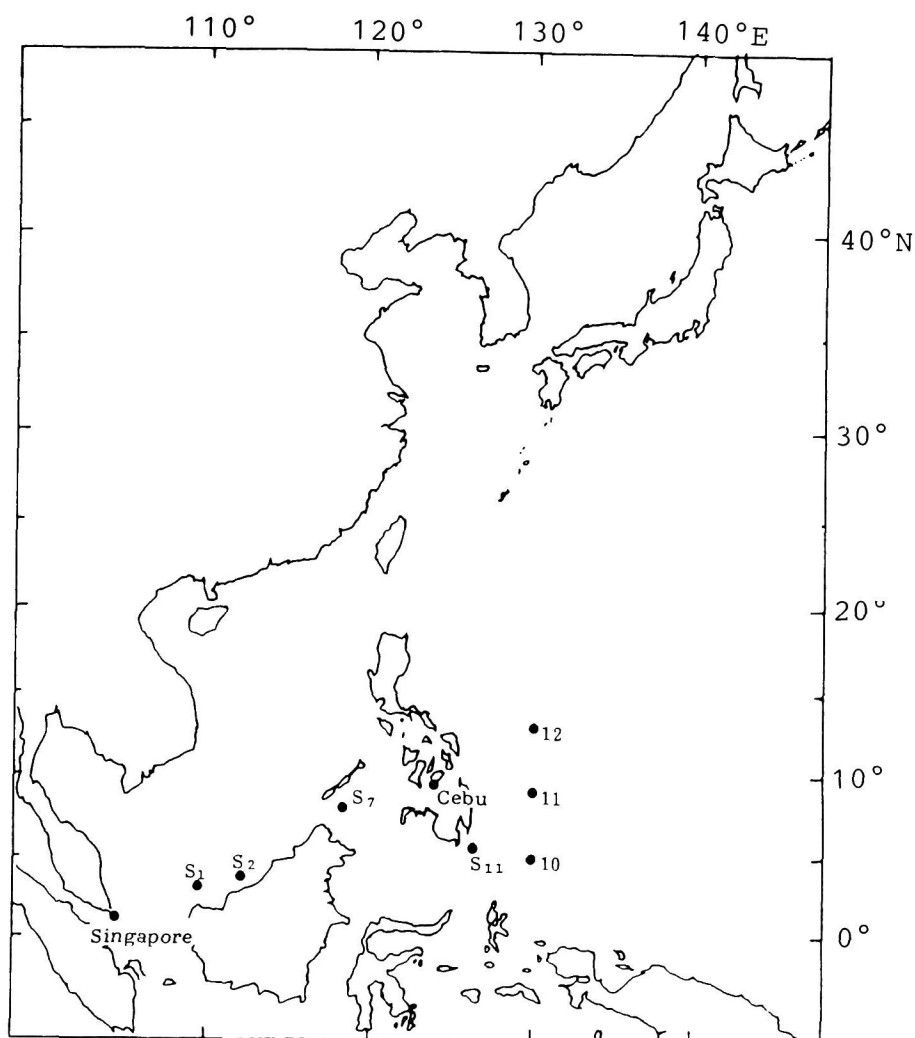


Fig. 3-6. Sampling locations in the South China Sea and West Pacific Ocean.

^{14}C -グルタミン酸, ^{14}C -タンパク加水分解物の4種類である。 ^{14}C -有機物の比活性は第2章（材料と方法）で示したのと同じである。

塗抹寒天平板法（ $\text{ST}10^{-1}$ 培地, 1.5 % 寒天濃度）による計数も ^{14}C -MPN法と平行して行った。

海水中のクロロフィルa量は、ターナー-111型蛍光光度計により測定（Strickland and Parsons, 1972）し、濁度（NTU, Nephelometric Turbidity Units）は、DRT-15型濁度計（HF Instruments, Canada）により

測定した.

結 果

低栄養細菌の分布

各水域で行った ^{14}C -MPN法と通常の寒天平板法による細菌計数結果を Fig. 3-7に示した. ここには, 4種類の ^{14}C -有機物を使って得た ^{14}C -MPN値のうち, 最も高い計数値を示した. 西太平洋海域 (Stns. S₁₁, 10,

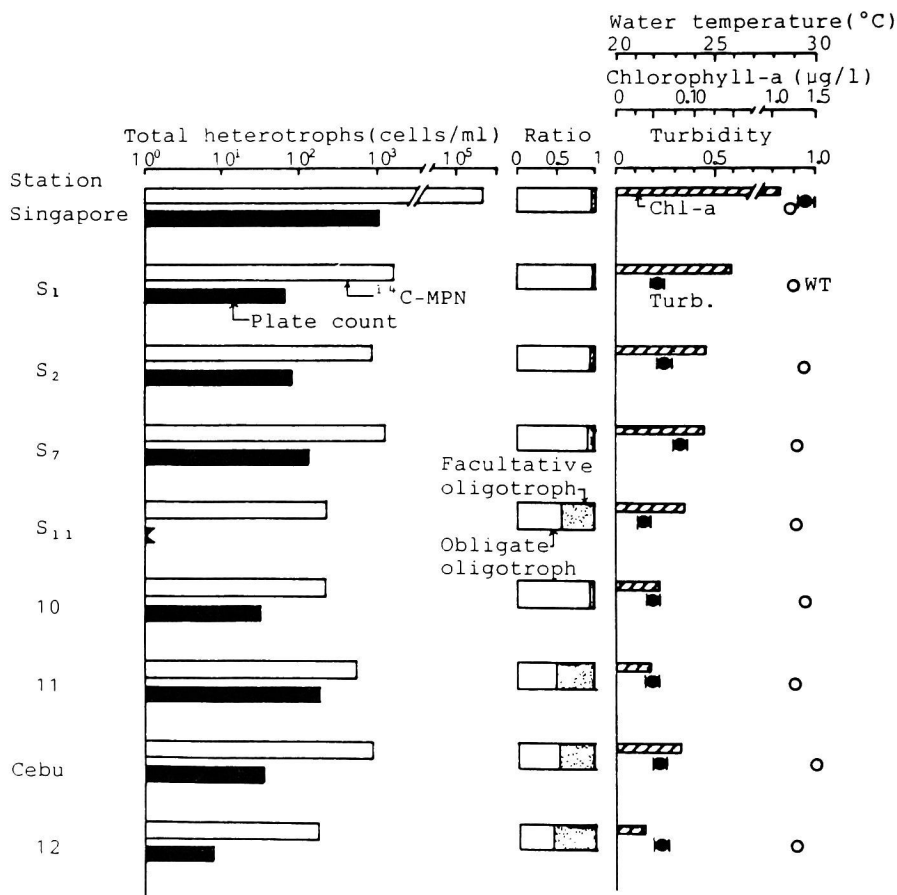


Fig. 3-7. Horizontal distribution of total heterotrophs and the ratio of obligate and facultative oligotrophs to total heterotrophs. Chl-a, chlorophyll-a; Turb., turbidity; WT, water temperature.

11, 12) の表層海水中 (0.5m 層) の全従属栄養細菌数 ($2 \sim 7 \times 10^2$ cells \cdot ml $^{-1}$) は, 他の南シナ海 (Stns. S₁, S₂), Sule海 (Stn. S₇), Cebu島近海のBohol海峡 (Stn. Cebu) に比べ1桁低くなった. 全従属栄養細菌数が最も多かったのは, Singapore港の沖合い1.5kmの測点 (Stn. Singapore) で, 2.2×10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ であった. 低栄養細菌の水平分布は海水中のクロロフィルa量や濁度と良い正の相関を示した (クロロフィルaで $r^2=0.72$). 西太平洋及び南シナ海では常に ^{14}C -MPN値が $\text{ST}10^{-1}$ 培地を用いたT-MPN値やコロニー計数値より高く, いずれの測点の表層海水 (0.5m depth) にも富栄養細菌は全く検出できなかった. 従って, ここでは全低栄養細菌を示す ^{14}C -MPN値が全従属栄養細菌に相当した. 偏性低栄養細菌が全従属栄養細菌に占める割合は45~98%であった.

Stns. 11, と12 の従属栄養細菌群, クロロフィルa量, 水温, 濁度の鉛直分布をFig. 3-8に示した. 両測点とも, 表層海水 (0.5m層) 中の従属栄養細菌数が最も高く (Stn. 11, 7.0×10^2 cells \cdot ml $^{-1}$; Stn. 12, 1.8×10^2 cells \cdot ml $^{-1}$), 水深と共に指数関数的に減少した. クロロフィルaのピークはStn. 11で75m, Stn. 12で125m層にあり, 従属栄養細菌数とは相関を示さなかった. Stn. 11の400m層, Stn. 12の150m層と400m層は全従属栄養細菌に占める富栄養細菌の割合が高かった (20~63%) が, その理由については不明である.

深海底泥表層の全従属栄養細菌数はStn. 11が 7.2×10^2 (cells \cdot g $^{-1}$), Stn. 12が 1.7×10^2 (cells \cdot g $^{-1}$) であり, 共に全従属栄養細菌の70%以上を偏性低栄養細菌が占め, 富栄養細菌は全く検出されなかった.

基質利用特性

各測点における各種有機物を利用する細菌数を, 4種類の ^{14}C -有機物をトレーサーレベルで用いた ^{14}C -MPN法で測定し, その結果をFig. 3-9に示した. 南シナ海 (Stns. S₁とS₂) とSule海 (Stn. S₇) の表層 (0.5m 層) ではタンパク加水分解物を利用する細菌が優占し, 西太平洋 (Stns. S₁₁, 10, 11と12) とBohol海峡 (Stn. Cebu) ではグルコース利用細菌が優占する傾向を見せた. しかしながら, 酢酸を利用する細菌数は, Singa-

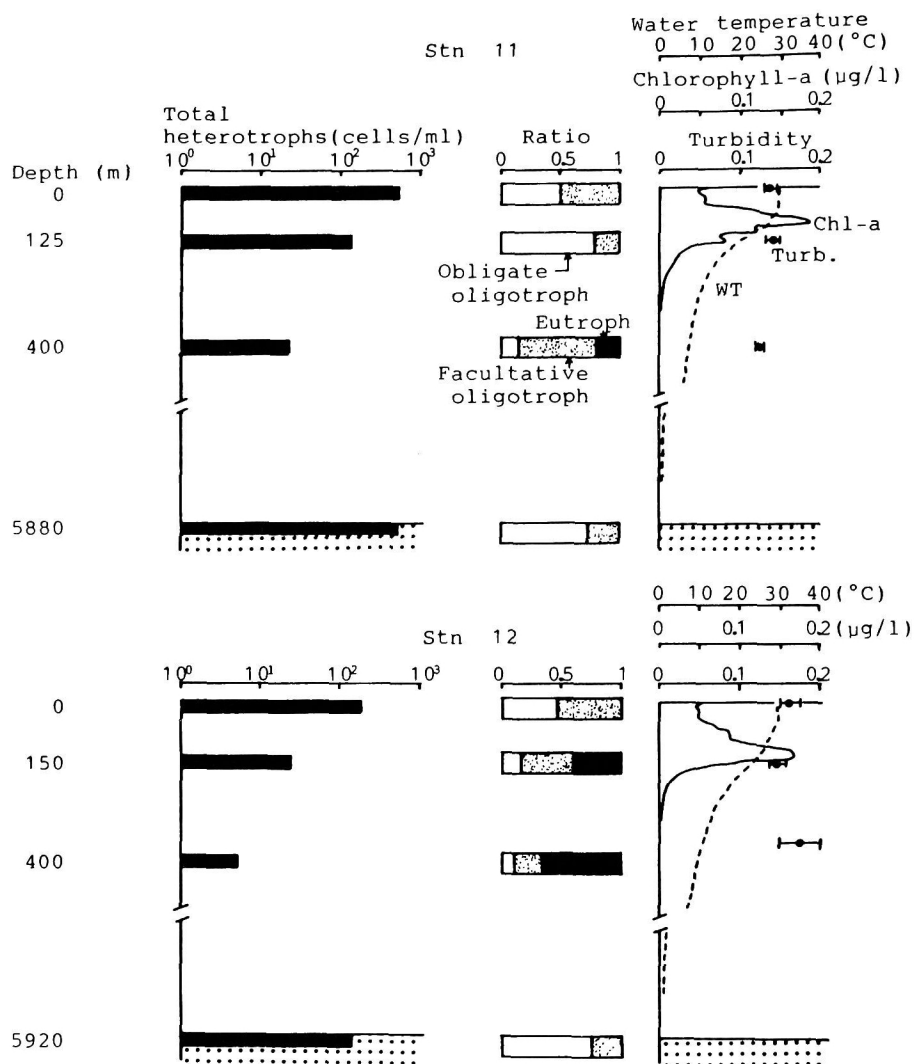


Fig. 3-8. Vertical distribution of total heterotrophs counted by the ¹⁴C-MPN method at Stns. 11 and 12 in the West Pacific Ocean. See legend to Fig. 3-7 for the abbreviations.

pore港とBohol海峡を除く外洋域の測点の表層海水すべてにおいて低くなった ($p=0.05$) .

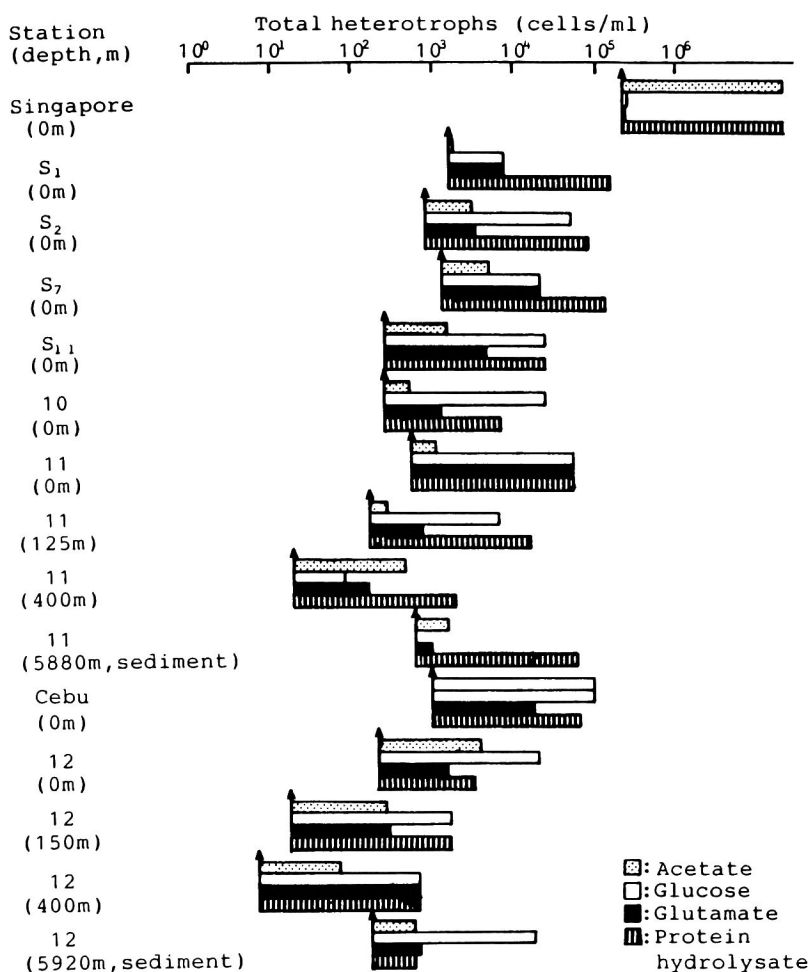


Fig. 3-9. The number and ratio of oligotrophs utilizing acetate, glucose, glutamate and protein hydrolysate.

考 察

南シナ海、西太平洋などの外洋域の表層海水中的¹⁴C-MPN法から算出した全従属栄養細菌数は $1.3 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^3$ cells \cdot ml⁻¹ (av. 9.1×10^2 cells \cdot ml⁻¹)であり、そのうち45~98%が偏性低栄養細菌であった (Fig. 3-7)。この偏性低栄養細菌は、従来から用いられている高濃度有機物培地 (ex. ZoBell 2216E) を用いた濁りによるMPN法 (T-MPN値) や、

寒天平板計数法では検出できない細菌群である。 ^{14}C -MPN法を用いて算出した南シナ海や西太平洋の全従属栄養細菌数は、南西諸島海域 (Simidu et al., 1980) やAlaskaのCook海峡 (Horowitz et al., 1983) 等の外洋域の全従属栄養細菌数に関する従来の寒天平板法による報告に比べて1桁以上高くなり、 ^{14}C -MPN法が外洋域の細菌計数に有効であることを確認した。

4種類の ^{14}C -有機物を用いた ^{14}C -MPN法の結果から (Fig. 3-9), 低栄養細菌群が酢酸よりアミノ酸を好み、利用する基質の範囲が比較的狭いことが明らかになった。南シナ海や西太平洋では、偏性低栄養細菌の全従属栄養細菌に占める割合が、琵琶湖北湖 (Ishida et al., 1980) と比べて高かった。

第3節 南極海

材料及び方法

試料の採取

海水試料の採取は研究船白鳳丸 (東京大学海洋研究所所属) のKH-83-4次研究航海 (1983年11月22日～2月24日) に参加して行った。試料を採取した測点をFig. 3-10に示した。試料の採取方法は本章第1節と同様に行い、すべての操作は現場水温 ($\pm 1^\circ\text{C}$) で行った。

サイズ画分

Stns. 5, 6, 及びPI-3の海水試料は滅菌した $5\mu\text{m}$ メッシュのナイロンネットを用いてサイズ画分を行い、海水の試料全体と $5\mu\text{m}$ 以上の画分 (付着細菌群) との細菌計数の比較を行った。

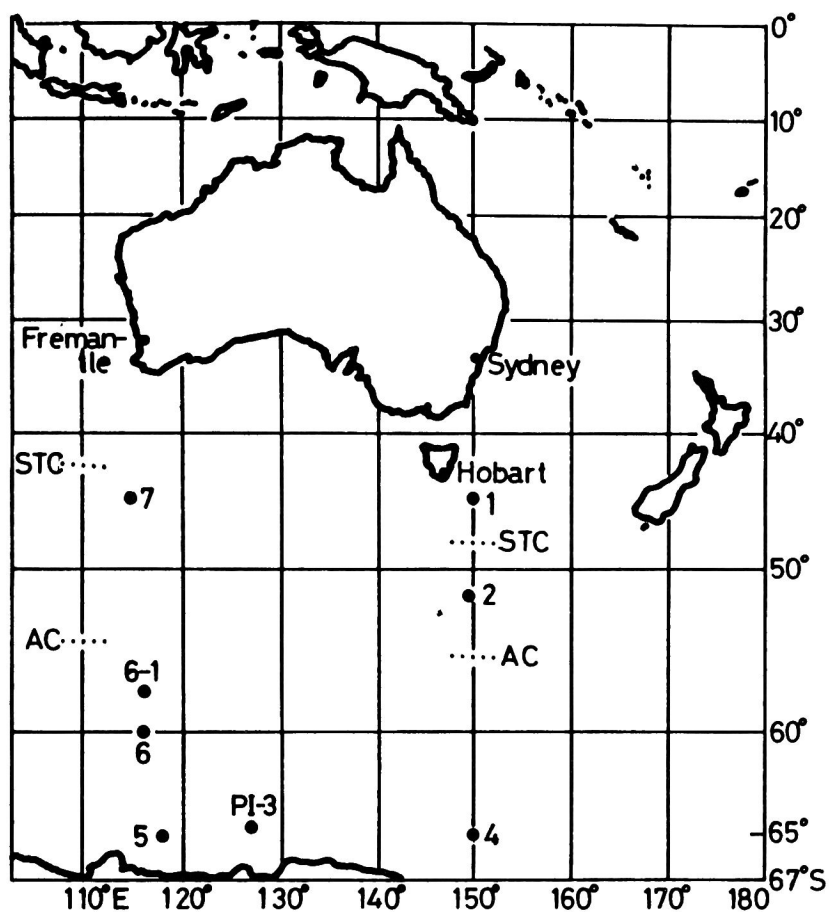


Fig. 3-10. Sampling locations in the Antarctic Ocean. STC, Subtropical Convergence; AC, Antarctic Convergence.

細菌の計数方法

^{14}C -MPN法は第2章（材料及び方法）で述べたのと同様の手順で行った。 ^{14}C -MPN法に使用した ^{14}C -有機物の種類は、 ^{14}C -酢酸、 ^{14}C -グルコース、 ^{14}C -グルタミン酸、 ^{14}C -グリシンと ^{14}C -グリコール酸の5種類である。

結 果

低栄養細菌の分布

^{14}C -ST 10^{-4} 培地とST 10^{-1} 培地を併用して計数した全従属栄養細菌数と

全従属栄養細菌に占める富栄養細菌，通性低栄養細菌，偏性低栄養細菌の割合をFig. 3-11に示した．表層海水中（0.5m層）の従属栄養細菌数は亜熱帯収束線（Subtropical Convergence）と南極海前線（Antarctic Convergence）の間に位置するStn.1とStn.7で最も高く（ $2.4 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ），南極海前線よりわずかに北方のStn.2が最も低かった（ $2.0 \times 10^1 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）．南極海域に位置するStns.4, 5, PI-3, 6, と6-1 の従属栄養細菌数は， $1.1 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ （av. $8.2 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）であった．富栄養細菌を検出したのは海水帯（Pack Ice Zone）に位置するStn.PI-3のみで，それ以外の測点では外洋域の例に洩れず，低栄養細菌，とりわけ偏性低栄養細菌が優占していた．

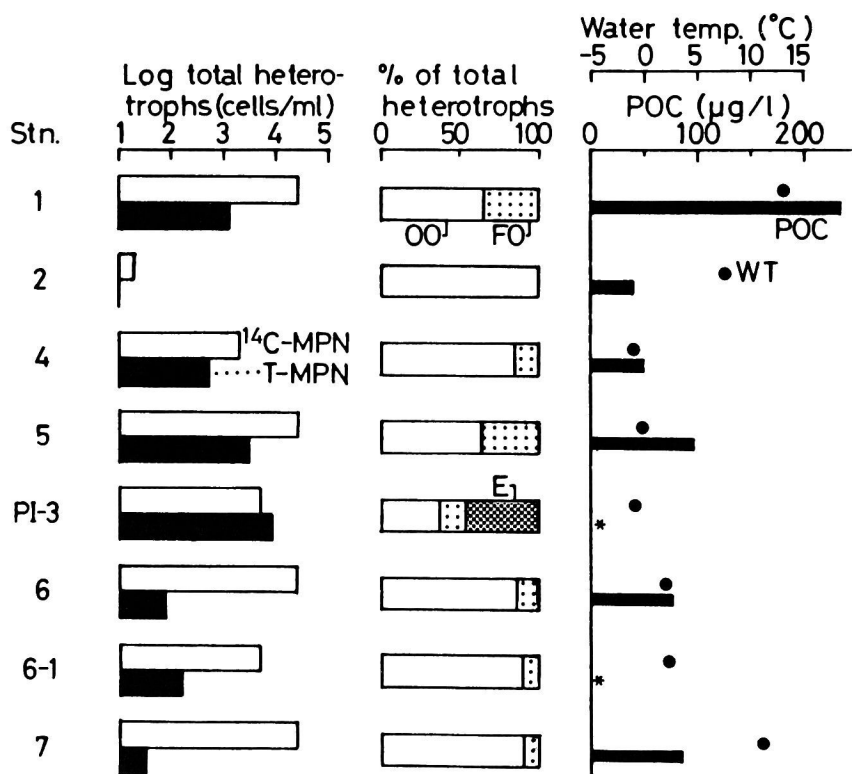


Fig. 3-11. Comparison of the number of total heterotrophs, the ratio of ^{14}C -MPN to T-MPN, and the ratio of obligate oligotrophs, facultative oligotrophs and eutrophs to total heterotrophs in the Antarctic Ocean. OO, obligate oligotrophs; FO, facultative oligotrophs; E, eutrophs; *, POC (particulate organic carbon) not measured.

Stn. 5とStn. 6では、滅菌した5 μ mメッシュのナイロンネットを用いて試水を分画し、試水全体と粒子径5 μ m以上の画分の従属栄養細菌（以下、付着細菌群とする）の比較を行った（Fig. 3-12）。付着細菌群はStn. 5で、濾過していない全海水の従属栄養細菌群（以下、全海水細菌群とする）の0.1%，Stn. 6で1.0%と少なかった。付着細菌群では、偏性低栄養細菌の占める割合が、Stn. 5とStn. 6共に全海水細菌群に比べて低く、高濃度有機物環境で増殖可能な通性低栄養細菌や富栄養細菌が優占した。

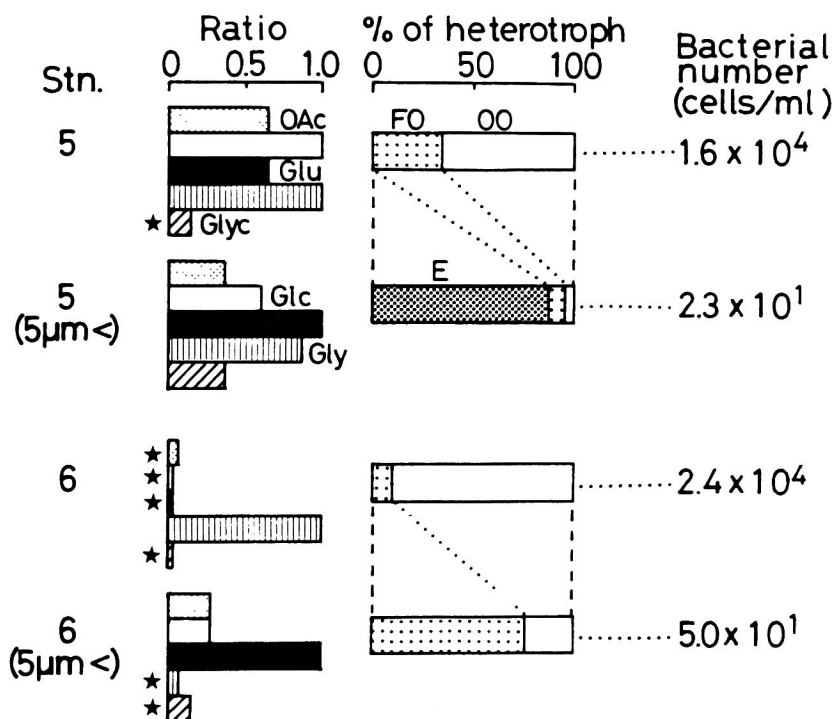


Fig. 3-12. Comparison of the ratio of heterotrophs utilizing OAc, Glc, Glu, Gly and Glyc, and the ratio of OO, FO and E to total heterotrophs between whole seawater and particulate fraction (> 5 μ m; attached bacteria) in the Antarctic Ocean (Stns. 5 and 6). Bacterial numbers are total heterotrophs and stars indicate the counts that are significantly lower ($p=0.05$) than the highest counts. See legend to Fig. 3-4 for the abbreviations.

基質利用特性

従属栄養細菌群の基質利用特性を、各種 ^{14}C -有機物を用いた ^{14}C -MPN法により明かにし、その結果をFig. 3-13に示した。亜熱帯水域と南極水域のいずれの測点も外洋域の典型的な特徴を示し、グリシンの利用性が高いのに対して、酢酸、グリコール酸の利用性が低かった。5種類の ^{14}C -有機物の利用性に有意差を認めなかったのはStn.PI-3であり、この測点は

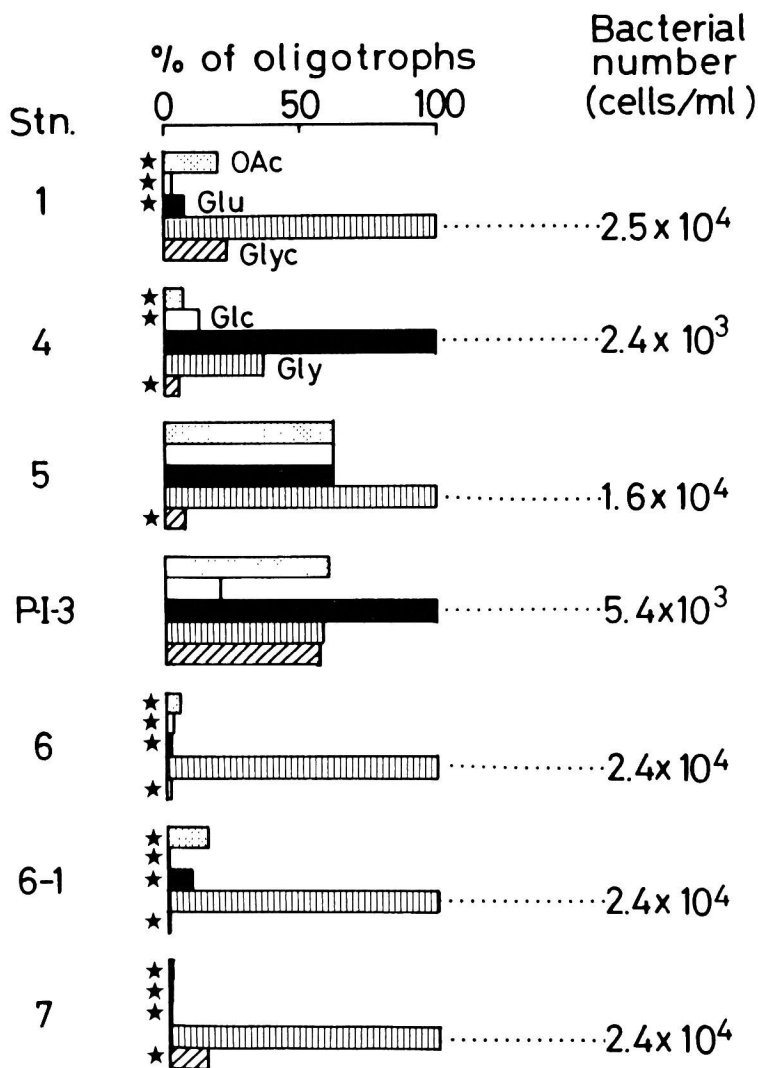


Fig. 3-13. The ratio of oligotrophic bacteria utilizing OAc, Glc, Glu, Gly and Glyc in the Antarctic Ocean. See legend to Fig. 3-4 for description.

尾鷲湾 (Stn. A) などの有機物濃度の高い内湾域とよく似た傾向を示した。

Stn. 5とStn. 6での付着細菌群と全海水細菌群との基質利用性を比較した (Fig. 3-12)。Stn. 5の全海水ではグリコール酸を利用する細菌数と最も高い計数値 (グリシン, グルコース) の間に統計的に有意な差 ($p=0.05$) があったが, 付着細菌群は基質利用性に差がなかった。Stn. 6では全海水中でグリシンを利用する細菌群が他の4種類の基質より高い計数値を示した ($p=0.05$) のに対し, 付着細菌群はグルタミン酸の利用性が特に高く, 全海水では利用性の低かった酢酸やグルコースも利用するようになり, 逆にグリシン利用細菌数が最も低くかった ($p=0.05$)。

考 察

Wiebe and Hendricks (1971) は, 今回の調査とほぼ同じ測点で, 寒天平板 ($ST10^{-1}$ 培地相当) を用いた塗抹法により従属栄養細菌数の鉛直分布を調べている。その計数結果と今回の ^{14}C -MPN法による計数結果を比較すると, ^{14}C -MPN法による計数値は, 従来の寒天平板法による計数値より10~100倍高くなった。また, ^{14}C -MPN法による従属栄養細菌の計数値は, Hanson et al. (1983) がFDC (frequency of dividing cells) 法により同水域で得た分裂している細菌数とほぼ同程度であり, ^{14}C -MPN法による細菌数が現場の生菌数を十分に反映していると考ええる。

海水帯 (Pack Ice Zone) のStn. PI-3を除くすべての測点で, 全従属栄養細菌のすべてが低栄養細菌であり, 特に偏性低栄養細菌の占める割合が高かった (Fig. 3-11)。この結果は, 熊野灘海域 (本章第1節) や西太平洋, 南シナ海 (本章第2節) での結果とよく似ており, この傾向は外洋域の特徴とみなせる。ただ, Stn. PI-3は細菌数が 5.4×10^3 (cells \cdot ml $^{-1}$) と他の外洋域の試料と同程度であるにも拘らず, 全従属栄養細菌に占める偏性低栄養細菌の比率が40%と低く, 逆に他の試料中には検出できなかった富栄養細菌が45%と高い割合を占めた。今回の実験を行った時期は, 丁度南半球の夏季にあたる。この時季ice algaeが海水中で活発に増殖する (Ackley et al., 1979)。このice algaeが海水の溶解と

ともに海水中に溶出するため、海水縁辺部では全般に有機物濃度が上がり、生物活性が上昇する (Gillespie et al., 1976; El-Sayed and Taniguchi, 1981)。従って、Ice algaeの為に局所的に高濃度有機物環境が形成され、その結果、高濃度有機物環境を好む富栄養細菌の全従属栄養細菌に占める比率が高くなったと推察される。

粒径 $5\mu\text{m}$ 以上の画分中の従属栄養細菌群（付着細菌群）の計数は、Stn.5とStn.6で行った。付着細菌群の計数値はStn.5とStn.6で、それぞれ 2.3×10^1 、 2.0×10^1 ($\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) となり、海水全体の全従属栄養細菌数に対する割合は、それぞれ0.1と1.0%と非常に小さかった (Fig. 3-12)。特徴的なのは、付着細菌群中の偏性低栄養細菌、通性低栄養細菌、富栄養細菌の構成比が海水全体と比べるとかなり異なる点である。Stn.5の場合、海水全体ではほぼ100%低栄養細菌が優占し、富栄養細菌は検出できないのに対して、付着細菌群では富栄養細菌が約90%を占めた。Stn.6の場合、海水全体で82.1%を占める偏性低栄養細菌が付着細菌群では25.0%に減少し、高濃度有機物培地でも増殖可能な通性低栄養細菌が75.0%を占めた。このような海水全体と異なる付着細菌群の傾向は、基質利用特性にも表れた。Stn.5ではグリコール酸を利用する細菌数が、他の基質に比べ統計的に有意な差を持って ($p=0.05$) 低いのに対して、付着細菌群では使用した5種類の基質利用性の間に有意な差を認めなかった (Fig. 3-12)。Stn.6の海水全体の試料は熊野灘の試料にも認められる様な外洋海水に特徴的な傾向を見せ、グリシンを利用する細菌の計数値が、他の4種類のいずれの基質を利用する細菌計数値よりも高くなった ($p=0.05$)。一方、Stn.6の付着細菌群では基質特異性が低下し、しかも海水全体としては最も高い利用性を示したグリシンが最も低くなり、グルタミン酸利用菌が非常に高い計数値を示した。

付着細菌群と全海水の細菌群との比較は、例えば細胞体積の変化（付着細菌群>浮遊細菌群）(Alldredge et al., 1986) や従属栄養活性の変化 (Simon, 1985) などで行われているが、基質利用特性や生理的に異なるグループによって細菌群が構成されていることを明らかにしたのは、これが初めてである。

第4節 浦神湾と田辺湾

材料及び方法

試料の採取

海水及び底泥試料を採取した測点をFig. 3-14に示す。海水および底泥試料の採取は、1985年11月と1986年8月に浦神湾（Stns. U1とU2）で行い、1987年7月に田辺湾（Stns. T1とT2）で行った。浦神湾のStns. U1とU2では養魚筏を半年毎に移動して設置しており、田辺湾古賀浦のStn. T1は養魚筏を常設している測点である。Stn. T2は今までに養魚筏が設置されたことのない測点である。海水試料はVan-Dorn型採水器を用いて採取し、底泥試料はK-K式コアサンプラー（Kimata et al., 1960）を用いて採取

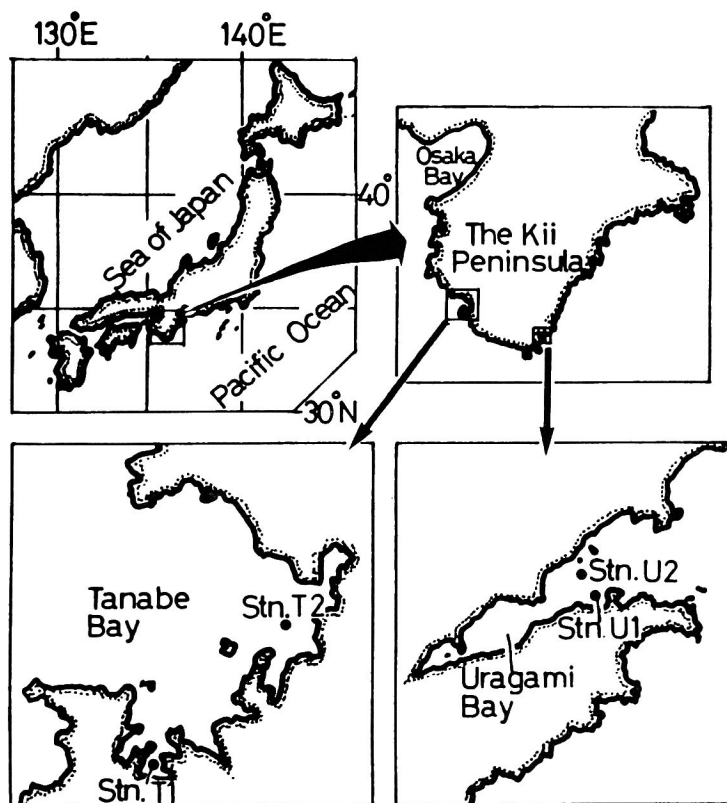


Fig. 3-14. Sampling locations in Tanabe and Uragami Bays.

した。底泥試料は採取後、船上で直ちに滅菌済みのヘラで底泥表面から1 cmきざみに切り取り、滅菌済みプラスチック製クリームビンに移した。海水試料も採取後直ちに船上で滅菌済み1,000ml-ガラスボトルに入れた。海水、底泥試料共に船上で氷蔵して実験室に持ち帰り、採取後3時間以内に実験を開始した。尚、持ち帰った海水試料は5 μ mメッシュの滅菌済みナイロンネットを用いて海水全体と5 μ m以上の画分（付着細菌群）とに分けて計数した。

細菌の計数方法

海水、底泥試料中の全従属栄養細菌の計数は、低濃度有機物培地（ST10⁻⁴培地）を用いる5本立DC-MPN法と高濃度有機物培地（ST10⁻¹培地）を用いる通常のT-MPN法を併用して行った（Fig. 2-1）。ST10⁻⁴培地は0.5 mgのトリプチケース（BBL）と0.05 mgのイーストエキス（Difco）を濾過熟成海水1lに添加して調製した。ST10⁻¹培地は第2章（材料及び方法）と同様にして調製した。各培養試験管中の細菌の増殖はST10⁻¹培地の場合、肉眼で濁りを判定するが、ST10⁻⁴培地の場合は濁りでは検定できないので、培養液を蛍光染色剤（DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole）で染色し（Potter and Feig, 1980）、落射型蛍光顕微鏡で観察して確認した（Fig. 2-1）。DAPIで染色する前に、ST10⁻⁴培地の各培養液を新たに調整したST10⁻¹培地へ約0.1 mlずつ接種を行う。この操作は¹⁴C-MPN法の場合と同様にして行った。偏性低栄養細菌、通性低栄養細菌、富栄養細菌の計数は基本的に¹⁴C-MPN法と同様である。

海水中の懸濁物や底泥試料中の全有機炭素量（TOC）、及び全有機窒素量（TON）は、CHN-corder（Yanako MT-2型）を用いて測定した。

結 果

浦神湾（1985年11月、1986年8月）における底泥及び底層水中の従属栄養細菌群の計数結果をFig. 3-15に示した。底泥中の全従属栄養細菌数は10⁶～10⁷ cells · g⁻¹ であり、いずれの底泥試料も通性低栄養細菌が従属

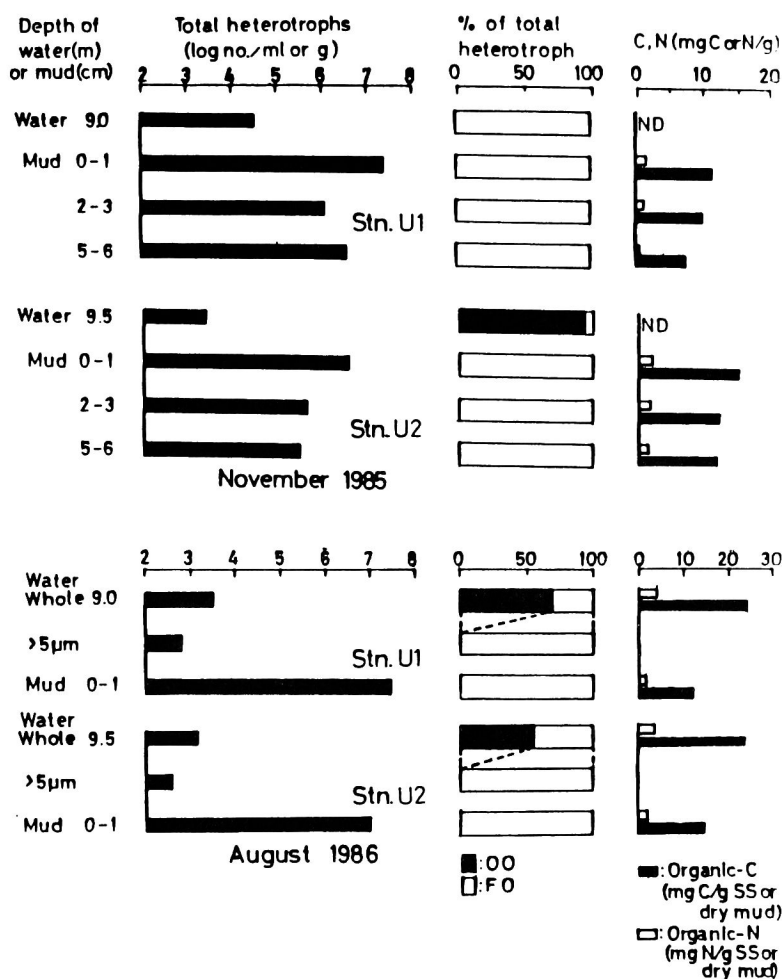


Fig. 3-15. Comparison of the number of total heterotrophs and ratio of obligate and facultative oligotrophs to total heterotrophs in Urugami Bay (November 1985, August 1986). ND, no data; OO, obligate oligotrophs; FO, facultative oligotrophs; E, eutrophs; Organic C, organic carbon; Organic N, organic nitrogen.

栄養細菌のすべてを占めていた。各泥深の全従属栄養細菌数と、そこに占める低栄養細菌、富栄養細菌の割合は、Stn. U1とStn. U2ともに同じ様な傾向を見せた。Stn. U1とStn. U2の底泥中のTOCとTON量もほぼ同程度であり、それぞれ乾泥1g当たり約12 mgC, 0.5 mgNであった。1985年11月の海水試料はStn. U1とStn. U2で異なる傾向を見せ、Stn. U1では通性低栄養細菌が圧倒的に優勢であったのに対し、Stn. U2は偏性低栄養細菌が優占

した。

浦神湾（1986年8月）の海水中の付着細菌群（ $>5\mu\text{m}$ ）の計数値は、Stn. U1とStn. U2ともに全従属栄養細菌数の約10%であった。海水全体では低栄養細菌、特に偏性低栄養細菌が多いのに対して、付着細菌群では通性低栄養細菌が圧倒的に優占した。田辺湾の海水試料（1987年8月）中の付着細菌群の計数値は測点、水深にかかわらずほぼ一定（約 $10^3\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ ）で、海水全体の全従属栄養細菌数の1%前後であった（Fig. 3-16）。田辺湾の海水試料も浦神湾と同様に、1試料を除くすべての海水試料の付着細菌群（ $>5\mu\text{m}$ ）で通性低栄養細菌が優占した。

田辺湾、特にStn. T1の底泥試料では、Fig. 3-16に示したように、全従属栄養細菌に占める富栄養細菌の比率が非常に高くなった（98%）。

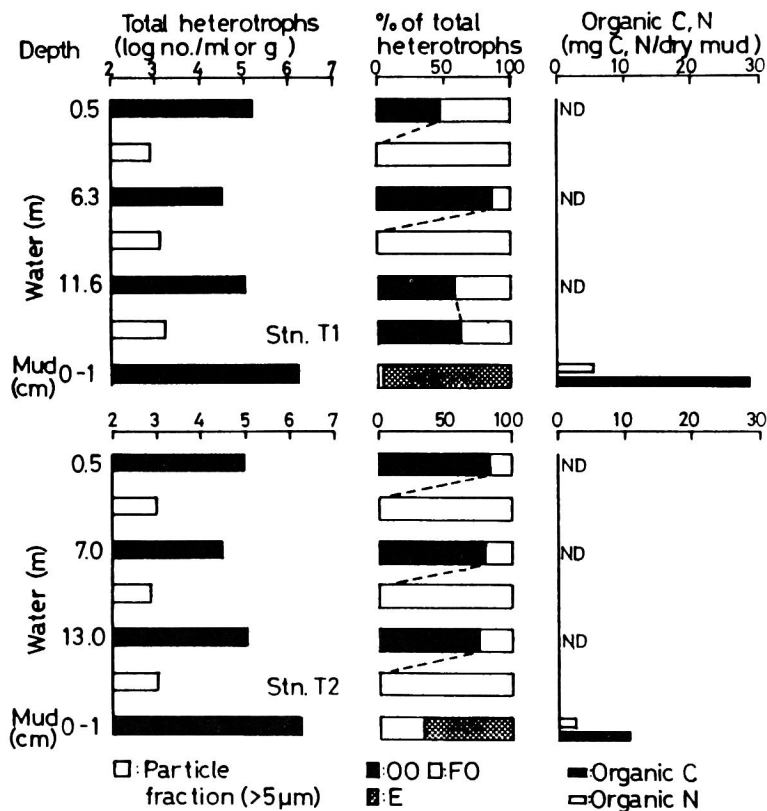


Fig. 3-16. Comparison of the number and ratio of heterotrophs in Tanabe Bay (July 1987). See legend to Fig. 3-15 for description.

Stn. T1の底泥中のTOC, TON量もStns. U1, U2, T2の底泥試料の2~3倍であった。

考 察

浦神湾では、毎年養魚筏を初夏の頃にStn. U2からStn. U1に移し、初冬の頃に再びStn. U1からStn. U2へ移している。その目的は2つあり、1つは夏の終わりから秋口にかけての台風シーズンに風波の影響を軽減することであり、他の1つは同一地点への連続的な有機物の負荷（残餌や養殖魚の排拙物など）による、海域、特に底泥の有機汚濁を防ぐことである。試料の採取を行った1985年11月と1986年8月は共に養魚筏がStn. U1に設置されていた。1985年11月、1986年8月いずれの調査時にも、そのとき養魚筏が設置されていたStn. U1の底泥中の全従属栄養細菌数がStn. U2より高い傾向を示したが、統計的に有意な差はなく、半年毎の養魚筏の移動は効を奏していると言えるかも知れない（Fig. 3-15）。底泥の従属栄養細菌群はすべて通性低栄養細菌が占めており、偏性低栄養細菌は全く検出できず、偏性低栄養細菌が優占する外洋域の海底泥（Fig. 3-8）とは異なる傾向を示した。底泥中の有機炭素量、有機窒素量には測点による差、調査時期による差はなかった。1985年11月の実験で特徴的なのは、Stn. U1の底層水（底上1m）中の従属栄養細菌群が通性低栄養細菌に占められているのに対し、Stn. U2の底層水では偏性低栄養細菌が優占している点である。浦神湾ではこの実験を行った日の2、3日前から、湾奥から湾口に向かう陸風が連続的に吹いており、その影響で沿岸湧昇が起こり外洋水が湾内に引き込まれ（Tsuda et al., 1988）、外洋域の影響をまともに受ける所に位置するStn. U2では偏性低栄養細菌が優勢になったのかもしれない。一方、養魚筏が設置され給餌が行われていた上に、仏崎の為に外洋の影響を受けにくいStn. U1では通性低栄養細菌が優占したと推察できる。

マリンスノーのような海水中の有機懸濁物の凝集体は栄養物の豊富な微小世界（microcosms）を形成し、そこでは一次生産が活発な上に（

Shanks and Trent, 1979; Knauer et al., 1982; Prezelin and Alldredge, 1983), 懸濁物中の付着細菌群の従属栄養活性も, その回りの海水よりかなり高くなることが報告されている (Alldredge et al., 1986). ここでは, 付着細菌群と海水全体の細菌群の違いを明らかにするため, 有機物濃度の異なる2種類の培地を併用して計数実験を行った. その結果, 海水全体としては偏性低栄養細菌が優勢になる場合でも, 付着細菌群では高濃度有機物環境で増殖可能な通性低栄養細菌の優占することが明らかになった (Fig. 3-15, Fig. 3-16).

浦神湾と異なり, 田辺湾, 特にStn.T1の底泥では富栄養細菌が優占した (Fig. 3-16). Stn.T1は底泥中の有機物量も他の測点の底泥試料の2~3倍高かった. 田辺湾のStn.T1では, 長年養魚筏が常設されており, 海水の交換率も非常に悪いので, 水域, 特に底泥の有機汚濁はかなり進行している. 従って, それが高比率での富栄養細菌の検出につながったと考える. 今まで養魚が行われたことのないStn.T2の底泥でも, 富栄養細菌と通性低栄養細菌が優勢になった. Stn.T2は, 河川から生活排水が大量に流れ込む上, 田辺湾で頻発する赤潮プランクトンの死骸が沈降, 堆積しやすい所に位置していることから, 養魚とは異なる原因による有機汚濁が進行している模様である. このような傾向は, Shiaris et al. (1987) が通常の寒天平板培地と有機物濃度の低い寒天平板培地 ($0.08\text{mg C} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加) を用いた下水汚物の流入する内湾域の底泥中の細菌計数実験でも報告している.

第5節 摘 要

(1) 有機汚濁の進行した尾鷲湾では, 従属栄養細菌数が常に $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上であり, 富栄養細菌や通性低栄養細菌が優占したが, 外洋域の熊野灘や高知沖では従属栄養細菌数が $10^3 \sim 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ であり, 低栄養細菌, 特に偏性低栄養細菌が優占し, 富栄養細菌は全く検出されなか

った。

(2) 尾鷲湾や伊勢湾の従属栄養細菌群は、利用基質に対する特異性が低く、いずれの基質も利用した。外洋域である熊野灘の従属栄養細菌群は、アミノ酸、特にグリシンをよく利用したが、酢酸やグリコール酸の利用性は低く、基質特異性が高かった。高知沖では、グリコール酸利用菌が優占した。高知沖での酢酸の利用性は低く、やはり内湾域に比べ基質特異性が高かった。

(3) 外洋の西太平洋域や南シナ海域の表層海水 (0.5 m層) や、深海底泥 (ca. 5,900 m) では、低栄養細菌群、特に偏性低栄養細菌が優占し、富栄養細菌は全く検出されなかった。

(4) 南シナ海とSulu海では、タンパク加水分解物を利用する細菌が優占し、西太平洋とBohol海峡では、グルコース利用菌が優占した。細菌の酢酸の利用性は、Singapore港とBohol海峡を除く全ての測点で低くなった。

(5) 南極海では、海水帯 (Stn. PI-3) を除くすべての測点で低栄養細菌群、特に偏性低栄養細菌が優占した。また、グリシン利用菌が多く、酢酸利用菌やグリコール酸利用菌は少なかった。

(6) 養魚筏の設置されているような内湾域 (浦神湾と田辺湾) の底泥では、偏性低栄養細菌は全く存在せず、通性低栄養細菌または富栄養細菌が優占していた。

第4章 種々の海域において有機物の代謝活性に関わる低栄養細菌

緒言

Parsons and Strickland (1962) は, Michaelis-Menten の酵素活性式に水生細菌群の従属栄養活性が従うと考え, その測定方法を考案した. この方法を改良した Hobbie and Wright (1965), Wright and Hobbie (1966) は低濃度での低分子有機物の取り込みは主として細菌群が行い, 藻類などによる取り込みはほとんど無視できると結論している. ここでは Wright and Hobbie (1966) の方法を用いて従属栄養細菌群の現場での基質取り込み活性を測定し, 種々の海域における低栄養細菌群の存在と従属栄養活性との関係を論じた.

材料及び方法

基質取り込み活性の測定

取り込み活性の測定は Parsons and Strickland (1962) が考案し, Wright and Hobbie (1966) が改良した方法に従った. 実験に用いた ^{14}C -有機物の種類は, 西太平洋と南シナ海, 及び熊野灘と尾鷲湾の1982年4月の調査では, ^{14}C -グルタミン酸と ^{14}C -酢酸の2種類の基質を用い, それ以外の熊野灘 (1982年9月), 尾鷲湾と熊野灘 (1983年4月), そして南極海の調査では, ^{14}C -グルタミン酸, ^{14}C -グルコース, ^{14}C -グリコール酸, ^{14}C -グリシン, と ^{14}C -酢酸の5種類の基質を用いて実験を行った. ^{14}C -有機物は第2章で ^{14}C -MPN法に用いたものと同じである. 添加した ^{14}C -有機物の最終濃度の範囲は Table 4-1 に示した. 基質濃度は5段階で行い, 各濃度段階ごとに5 mlの海水試料を3本, グルタルアルデヒド (最終濃度0.5 %) を添加した5 mlの海水試料 (空試験) を1本用意して測定を行った. ^{14}C -基質を添加した海水試料 (空試験用の1本を含む合計4本) は, 現場水温 ($\pm 1^\circ\text{C}$), 暗所で1~6時間培養を行った. 培養後, 直ちに各海水試料は孔径0.22 μm のメンブレンフィルター (Millipore社製)

Table 4-1. Final concentrations used in the measurement of the uptake kinetics.

Substrate	Concentration range (nM)	
Acetate	84	420
Glutamate	57	285
Glucose	57	285
Glycolate	277	1385
Glycine	67	335

に濾過し、滅菌濾過海水10 mlで3回、フィルターを洗浄した。洗浄後、赤外線ランプによりフィルターを乾燥した。この乾燥したフィルターをトルエン系シンチレーターを10 ml入れたバイアルビンに入れ、フィルター上に捕集した放射線量を液体シンチレーションカウンター（Packard Tri-CARB Model 2425またはLKB Wallack Rackbeta 1215）で計測した。

細菌群の基質取り込み活性がMichaelis-Mentenの酵素活性式に従うと考えた場合、基質濃度が上がれば細菌による取り込み量は双曲線状に増大し、一定濃度に達すると飽和状態になる。従属栄養活性のパラメーター（ V_{max} 、 T_t と K_m ）の算出方法を以下に示す。

$$v = c(S_n + A) / C \mu t \quad \dots \dots \dots (1)$$

(1)式で、 v は基質取り込み速度、単位は $nM \cdot h^{-1}$ 、 c はフィルター上に捕集した細菌が取り込んだ ^{14}C -基質の測定値（dpm）を示し、 S_n は各基質の天然海水中の濃度（nM）を示す、 A は添加した基質の濃度（nM）を示す、 C は定数で、 ^{14}C でラベルされた基質 $1 \mu Ci$ 当りの計数値（ 2.2×10^6 dpm）である、 μ は海水試料に添加した ^{14}C -基質の μCi 数、 t は培養時間（h）を示す。Lineweaver-Burkの逆数プロットを行い、(1)式の逆数を取ると(2)式のようなになる。

$$(S_n + A)/v = (K_t + S_n)/V_{\max} + A/V_{\max} \cdots \cdots (2)$$

ここで、 V_{\max} は最大基質取り込み速度 ($\text{nM} \cdot \text{h}^{-1}$)、 K_t は細菌群の基質親和性を示す取り込み定数である。(1)、(2)式から(3)式をみちびく。

$$(C \mu t)/c = (K_t + S_n)/V_{\max} + A/V_{\max} \cdots \cdots (3)$$

天然海水中の基質濃度 (S_n) は未知だから、既知の添加した基質濃度 A (nM) に対する $C \mu t/c$ 値をプロットすることで(3)式を適用する。

この算出法により、現場での最大基質取り込み速度 (V_{\max})、現場海水中的の基質を完全に取り込むのに要する、代謝回転時間 (T_t , Turnover time)、従属栄養細菌群の基質親和力 (K_t) と天然海水中的の基質濃度 (S_n) を合計した値 ($K_t + S_n$) の以上3つの情報を得ることができる。さらに、 S_n を実測すると、 S_n/T_t から現場での基質の代謝速度 (flux rate, v)、および K_t を求めることが可能になる。細菌細胞当りの最大基質取り込み速度 (V_{\max}/cell) は、 ^{14}C -MPN法により得られた全従属栄養細菌数を用いて算出した。

結 果

尾鷲湾 (Stns. AとB) と熊野灘 (Stns. CとD)

最大基質取り込み速度 (V_{\max})、 $K_t + S_n$ 、代謝回転時間 (T_t)、及び細菌細胞当りの V_{\max} 値 (V_{\max}/cell) を Table 4-2 に示した。いずれの基質の場合も、従属栄養細菌数の多い内湾域 (尾鷲湾) よりも従属栄養細菌数の少ない外洋域 (熊野灘) の方が V_{\max} が低く、 T_t が長くなった。1982年4月と1983年4月の Stn. C と Stn. D のグルタミン酸の T_t は $34.8 \sim 173.5 \text{ h}$ (av. 97.2 h) で、 V_{\max} は $5.3 \sim 6.2 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $5.6 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$) であった。Stns. A と B に比べて Stns. C と D の T_t 値は10倍以上高く (長く)、 V_{\max} 値は1/3以下であった。酢酸の取り込み活性は更に顕著な傾向を示した。1982年4月の実験では、酢酸の V_{\max} 値が Stn. A から Stn. C へ行くに従い

Table 4-2. Kinetic parameters for the uptakes of acetate (OAc), glutamate (Glu), glucose (Glc), glycolate (Glyc), and glycine (Gly) by heterotrophs in 0.5-m depth waters of Owase Bay and the Kumano-nada Sea.

Date	Stn.		Vmax (nM/h)	Turnover time (h)	Kt + Sn (nmol/l)	Vmax/cell [$\times 10^{-8}$ nmol/(h · cell)]
Apr. (1982)	A	OAc	12.3	64.2	737.3	2.5
		Glu	17.8	15.3	272.3	3.6
	B	OAc	2.8	38.4	108.9	2.2
		Glu	26.7	3.5	93.2	20.5
	C	OAc	1.5	679.8	1011.6	9.4
		Glu	6.2	83.2	515.1	38.8
	D	OAc	NMA	-	-	-
		Glu	5.4	34.8	187.9	33.8
Sep. (1982)	D1	OAc	NMA	-	-	-
		Glu	0.2	213.1	46.2	1.5
		Glc	0.1	1550.8	193.7	0.8
		Glyc	1.0	5233.7	4979.0	7.7
		Gly	1.2	217.1	262.0	9.2
	D2	OAc	NMA	-	-	-
		Glu	0.2	367.5	86.8	0.4
		Glc	0.1	1126.0	84.7	0.2
		Glyc	0.5	6369.6	3185.4	0.9
		Gly	0.8	264.2	224.1	1.5
Apr. (1983)	A	OAc	1.3	78.9	62.4	0.1
		Glu	15.5	4.2	64.4	1.7
		Glc	3.2	69.2	223.0	0.3
		Glyc	3.9	144.0	74.6	0.4
		Gly	3.1	12.9	39.4	0.3
	D	OAc	0.1	761.1	64.1	0.2
		Glu	5.3	173.5	911.0	9.8
		Glc	0.1	1134.5	138.3	0.2
		Glyc	0.6	1539.6	937.3	1.1
		Gly	0.3	299.1	83.4	0.6

NMA, no measurable activity.

Vmax/cell were calculated from heterotrophic bacteria counted by the ^{14}C -MPN method.

減少し、Stn.Dでは全く取り込みを示さなくなった。

高知沖

Vmax, Tt, Kt+SnとVmax/cellの各値をTable 4-3に示した。高知沖の海域においても、Stn. A2を除くすべての測点で、酢酸の取り込み活性を全く認めなかった。酢酸以外の基質のTt値は、グルタミン酸が、103.9～1117.6時間 (av. 555.0 h), グルコースが 782.3～2808.7時間 (av. 2034.3 h), グリコール酸が892.0～∞であり、グルタミン酸の取り込み活性が最も高く、ついでグルコースであった。グリコール酸は、酢酸ほどではないが、全く取り込み活性を認めない試料が9試料のうち2試料あった。細菌細胞当りの取り込み活性 (Vmax/cell) は、熊野灘海域などの他の外洋域と同程度であった。

西太平洋と南シナ海

実験は¹⁴C-グルタミン酸と¹⁴C-酢酸の2種類の基質について行い、得られたVmax, TtとKt+Snの3つのパラメーターをTable 4-4に示した。Singapore港の表層 (0.5 m) のVmax値は他の測点に比べて1桁高くなり、Tt値は1桁低く (短く) になった。Singapore港を除くすべての測点で酢酸 (濃度範囲 83～426 nM) に対する取り込み活性を全く認めなかった。Singapore港では、¹⁴C-MPN法から算出した酢酸利用菌数がグルタミン酸利用菌数より多いにもかかわらず、グルタミン酸のTtは酢酸のTtより1桁低くなった。

南極海域

現場水温での従属栄養細菌群の基質取り込み活性の測定は¹⁴Cでラベルした酢酸、グルコース、グルタミン酸、グリシンとグリコール酸の5種類の基質を用いて行い、それぞれの基質のVmax, Tt, Kt+SnとVmax/cellの4つの値をTable 4-5に示した。亜熱帯収束線～南極前線の海域に位置する測点 (Stns. 1, 7) の現場水温 (13 °C前後) での取り込み活性は南極海の試料に比べ、全般的にTtが短く、Vmaxが高い傾向を示した。南極前

Table 4-3. Kinetic parameters for the uptakes of acetate (OAc), glutamate (Glu), glucose (Glc), and glycolate (Glyc) by heterotrophs off the coast of Kochi in July 1982.

Stn.		V _{max} (nM/h)	Turnover time (h)	K _t + S _n (nM)	V _{max} /cell [$\times 10^{-8}$ nmol/(h · cell)]
	OAc	0.02	3040.3	47.5	1.7
A2 (0 m)	Glu	0.08	1117.6	87.6	8.5
	Glc	0.10	2019.0	184.0	9.9
	Glyc	0.04	7984.5	318.0	4.3
	OAc	NMA	-	-	-
A6 (0 m)	Glu	0.08	103.9	9.0	0.5
	Glc	0.10	1722.8	175.0	0.6
	Glyc	0.03	2703.6	77.8	0.2
	OAc	NMA	-	-	-
B1 (0 m)	Glu	0.08	950.8	76.4	2.9
	Glc	0.05	2325.4	111.0	1.7
	Glyc	0.06	8169.6	501.0	2.2
	OAc	NMA	-	-	-
B1 (125 m)	Glu	0.10	215.7	23.1	4.9
	Glc	0.08	2572.2	217.0	3.8
	Glyc	NMA	-	-	-
	OAc	NMA	-	-	-
C1 (0 m)	Glu	0.71	128.8	91.5	4.4
	Glc	0.31	2059.6	635.0	1.9
	Glyc	0.24	4526.4	1080.0	1.5
	OAc	NMA	-	-	-
C1 (125 m)	Glu	0.18	607.4	106.0	1.1
	Glc	0.15	2449.3	374.0	1.0
	Glyc	NMA	-	-	-
	OAc	NMA	-	-	-
D1 (0 m)	Glu	0.31	874.3	269.0	1.9
	Glc	0.21	2808.7	593.0	1.3
	Glyc	0.14	4277.5	590.0	0.9
	OAc	NMA	-	-	-
E12 (0 m)	Glu	0.14	617.8	88.7	0.9
	Glc	0.04	782.3	33.5	0.3
	Glyc	0.34	5505.2	1850.0	2.1
	OAc	NMA	-	-	-
FM-5-1 (0 m)	Glu	0.13	430.9	56.2	3.7
	Glc	0.08	1984.4	166.0	2.4
	Glyc	0.02	892.7	22.3	0.7

NMA, no measurable activity. V_{max}/cell were calculated from heterotrophic bacteria counted by the ¹⁴C-MPN method.

Table 4-4. Kinetic parameters for the uptakes of glutamate and acetate by heterotrophs in the South China Sea and the West Pacific Ocean from October to November 1981.

Station (Depth, m)	V_{max} ($\mu\text{M h}^{-1}$)	Turnover time (h)	$K_i + S_n$ (μM)
Singapore (0 m)	A 3.8×10^{-3} B 2.0×10^{-3}	43.2 642.9	0.16 1.26
S ₁ (0 m)	A 2.5×10^{-4} B NMA	614.1 —	0.16 —
S ₂ (0 m)	A 5.0×10^{-4} B NMA	672.2 —	0.39 —
10 (0 m)	A 2.7×10^{-4} B NMA	541.7 —	0.15 —
11 (0 m)	A 1.6×10^{-4} B NMA	563.6 —	0.09 —
11 (125 m)	A 8.9×10^{-5} B NMA	1117.5 —	0.10 —
Cebu (0 m)	A 3.3×10^{-4} B NMA	402.6 —	0.13 —
12 (0 m)	A 1.0×10^{-4} B NMA	1224.5 —	0.13 —
12 (150 m)	A 2.8×10^{-5} B NMA	11466.0 —	0.32 —

A: glutamate; B: acetate; NMA: no measurable activity

線以南の海域、すなわち南極海ではグルタミン酸、グリシンの取り込み活性が高いのに対して、酢酸、グリコール酸とグルコースの活性が低く、測点によっては全く取り込みを示さなかった。南極海のグルタミン酸の V_{max} 値は、 $0.04 \sim 0.30 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.14 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$) で、グリシンの V_{max} 値は $0.05 \sim 0.20 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.11 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$) であり、Stns. 1と7のグルタミン酸、グリシンの V_{max} と同程度であった。

取り込み活性に及ぼす水温の影響を明らかにするため、Stns. 5とPI-3では現場水温 (0°C 前後)、 10°C と 20°C の3段階、Stns. 6と6-1では現場水温 (2.5°C 、 5.0°C) と 20°C の2段階で取り込み活性の測定を行った。各培養温度における各基質の T_t 値をFig. 4-1, Fig. 4-2, とFig. 4-3に示した。Stn. 5では、いずれの基質も 20°C で T_t が最も長くなった (Fig. 4-1)。培養温度が現場水温 0.8°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) の場合と 10°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) の場合を比較すると、 10°C の方が活性が上がる (T_t が短くなる) 基質は、酢酸、グル

Table 4-5. Kinetic parameters for the uptakes of acetate (OAc), glutamate (Glu), glucose (Glc), glycolate (Glyc), and glycine (Gly) by heterotrophs in the Antarctic Ocean (KH-83-4 cruise, from November 1983 to February 1984).

Stn. (WT °C)		Vmax (nM/h)	Turnover time (h)	Kt + Sn (nmol/l)	Vmax/cell [$\times 10^{-8}$ nmol/(h · cell)]
1 (13.6°C)	OAc	0.34	170.1	59.0	2.1
	Glu	0.44	4.9	2.2	2.8
	Glc	0.22	13.7	3.0	1.4
	Glyc	0.25	196.2	48.0	1.6
	Gly	0.55	137.8	76.0	3.4
4 (-0.4°C)	OAc	0.03	3624.9	99.0	1.1
	Glu	0.04	422.1	24.0	2.3
	Glc	0.04	6804.6	210.0	1.3
	Glyc	0.12	1879.1	120.0	2.6
	Gly	0.13	1675.0	83.0	2.1
PI-3 (-0.1°C)	OAc	0.02	4008.6	78.0	0.4
	Glu	0.19	2817.3	550.0	3.5
	Glc	0.02	29260.9	650.0	0.4
	Glyc	NMA	-	-	-
	Gly	0.17	4521.1	760.0	3.2
5 (0.8°C)	OAc	0.14	2219.5	300.0	0.9
	Glu	0.25	280.7	71.0	1.6
	Glc	0.07	539.5	35.0	0.4
	Glyc	0.07	1937.0	140.0	0.5
	Gly	0.20	1288.7	250.0	1.3
6 (2.5°C)	OAc	NMA	-	-	-
	Glu	0.04	409.7	15.0	0.2
	Glc	NMA	-	-	-
	Glyc	NMA	-	-	-
	Gly	0.06	3663.1	200.0	0.4
6-1 (5.0°C)	OAc	0.03	14450.1	410.0	0.6
	Glu	0.08	607.3	49.0	1.8
	Glc	NMA	-	-	-
	Glyc	NMA	-	-	-
	Gly	0.08	1417.0	100.0	1.6
7 (12.0°C)	OAc	0.14	394.4	54.0	0.6
	Glu	0.20	50.1	10.0	0.8
	Glc	0.12	371.0	45.0	0.5
	Glyc	0.14	4586.9	630.0	0.6
	Gly	0.15	96.9	15.0	0.6

NMA, no measurable activity; WT, In situ water temperature (°C). Vmax/cell were calculated from heterotrophic bacteria counted by the ^{14}C -MPN method.

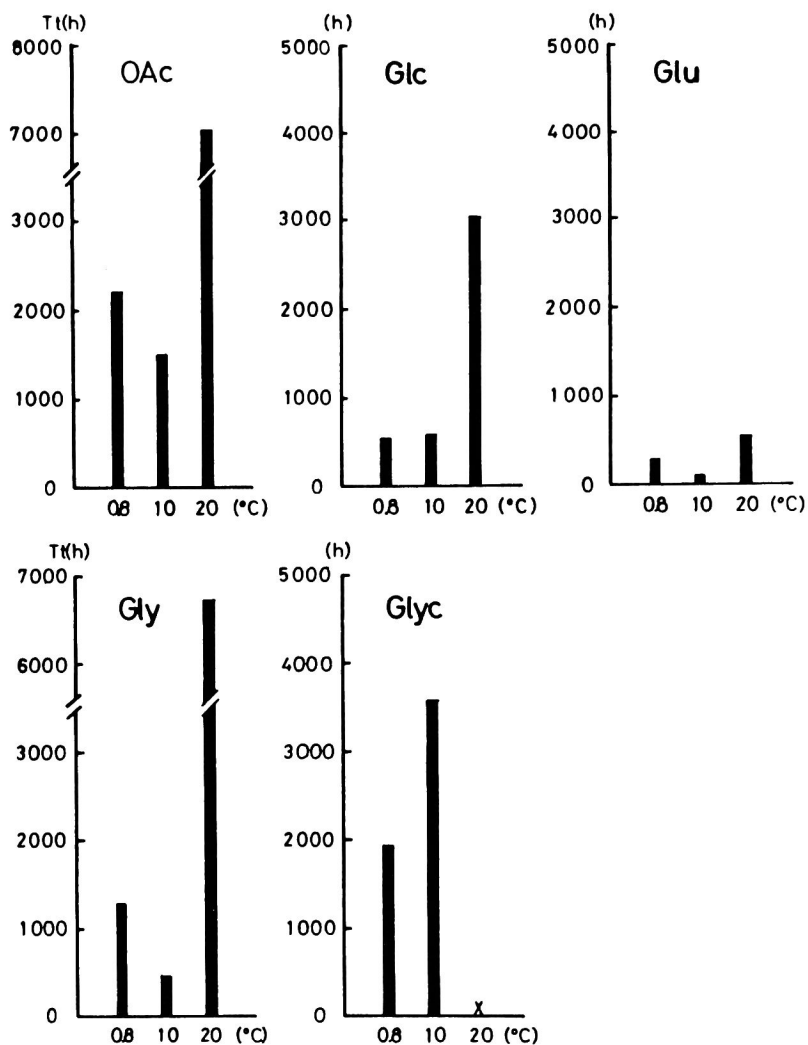


Fig. 4-1. Effect of incubation temperature on turnover-times of acetate (OAc), glucose (Glc), glutamate (Glu), glycine (Gly) and glycolate (Glyc) at Stn. 5 (Antarctic Ocean). In situ temperature was 0.8 °C.

タミン酸とグリシンであり、グルコースは同程度、グリコール酸では現場水温の方が高い活性を示した (Fig. 4-1)。海水帯の Stn.PI-3 では、いずれの基質も現場水温 (0 °C) で最も取り込み活性が低くなった (Tt が数 1,000 時間 ~ ∞)。酢酸、グルコースとグルタミン酸は 10 °C で最も活性が上がり、グリシンは 10 °C よりも 20 °C で更に活性が上がった。Stn.PI-3

では培養温度に関係なくグリコール酸を全く取り込まなかった (Fig. 4-2). Stns. 6と6-1では, 取り込み活性を認めたいずれの基質も20℃よりも現場水温での活性が高く, 現場水温で活性を認めなかった基質は, 20℃でも全く取り込み活性を示さなかった (Fig. 4-3).

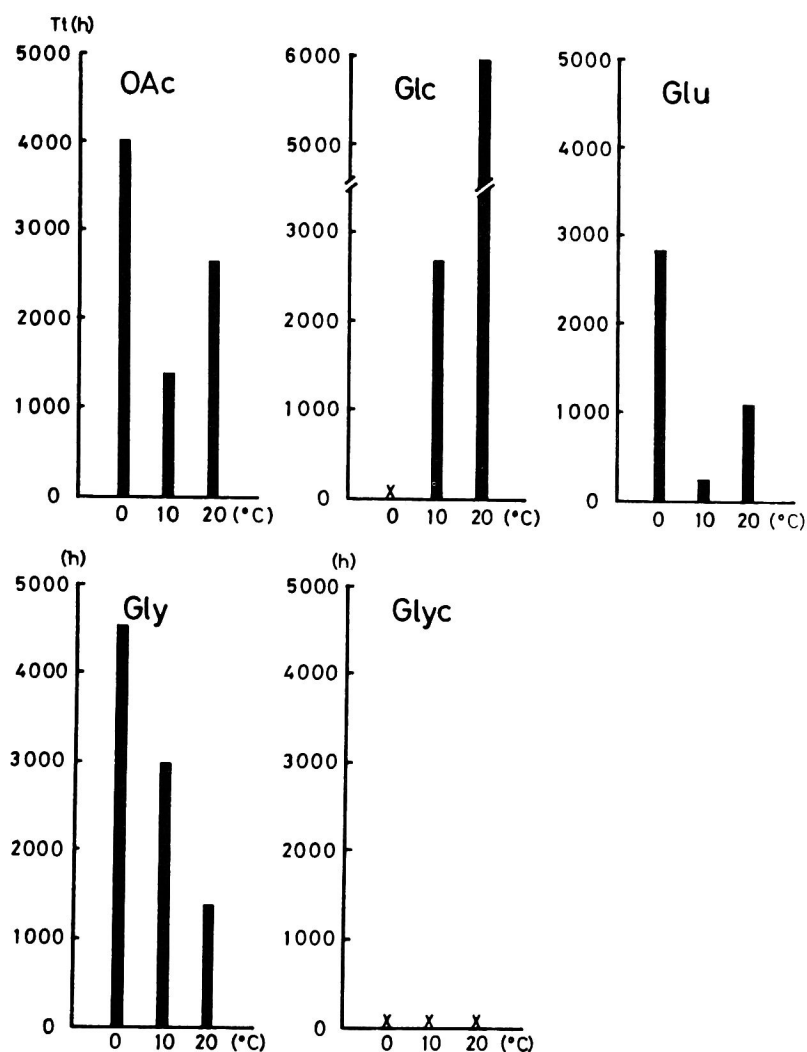


Fig. 4-2. Effect of incubation temperature on turnover-times of OAc, Glc, Glu, Gly and Glyc at Stn, PI-3 (Antarctic Ocean). In situ temperature was 0 °C. See legend to Fig. 4-1 for abbreviations.

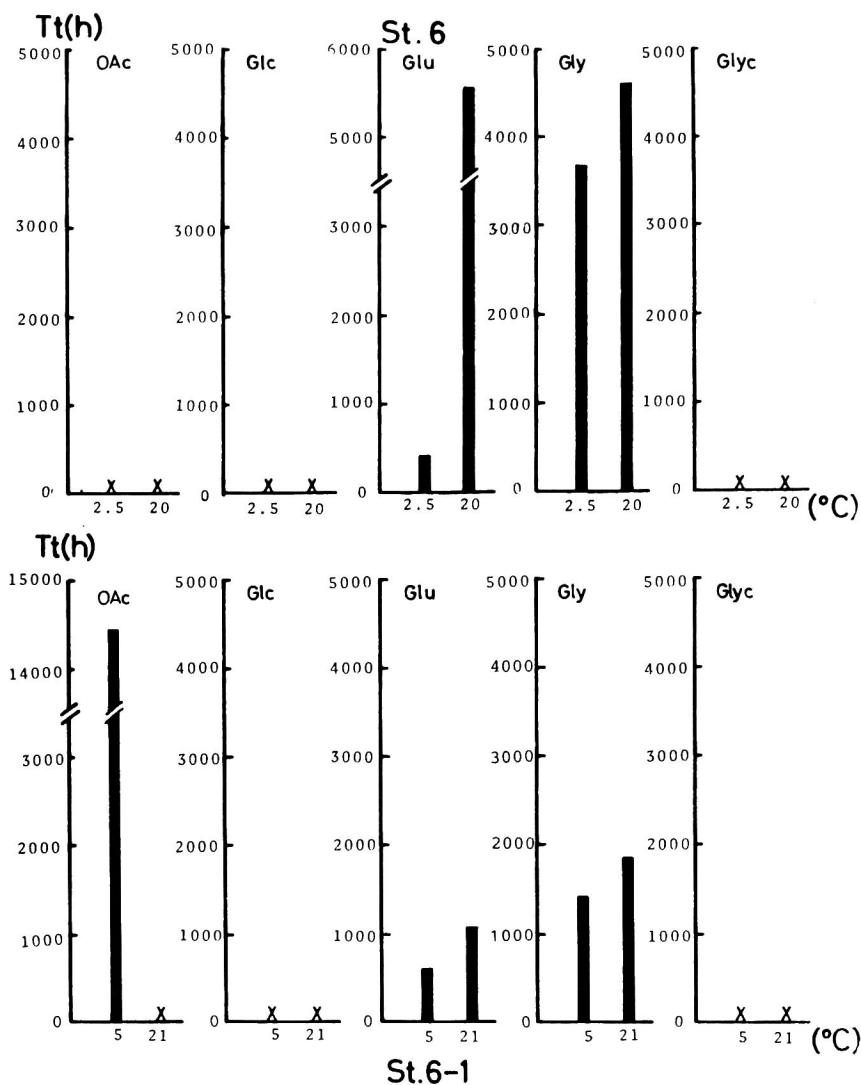


Fig. 4-3. Effect of incubation temperature on turnover-times of OAc, Glc, Glu, Gly and Glyc at Stns. 6 and 6-1 (Antarctic Ocean). *In situ* temperatures at Stns. 6 and 6-1 were 2.5 °C and 5.0 °C, respectively. See legend to Fig. 4-1 for abbreviations.

取り込み活性と従属栄養細菌数

種々の海域で行った現場での各基質の代謝回転時間 (Tt) と ^{14}C -MPN法で算出した全従属栄養細菌数との関係について調べた (Fig. 4-4). 用いた基質により異なる傾向を認めた. グルタミン酸は細菌数の増加に伴

い、代謝回転時間 (Tt) が短くなり、高い負の相関 ($r=-0.77$) を示した。グリシンの場合も高い負の相関 ($r=-0.76$) を認めた。グルコースの場合、従属栄養細菌数とTtの間には有意な相関を認めず、海水試料ごとの変動が大きかった。グリコール酸でも、有意な相関を認められず、全く取り込み活性を示さないものも6試料あった。酢酸の場合、全従属栄養細菌数が $10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下の海域では、25試料の内20試料が酢酸に対する取り込み活性を全く示さなかった。

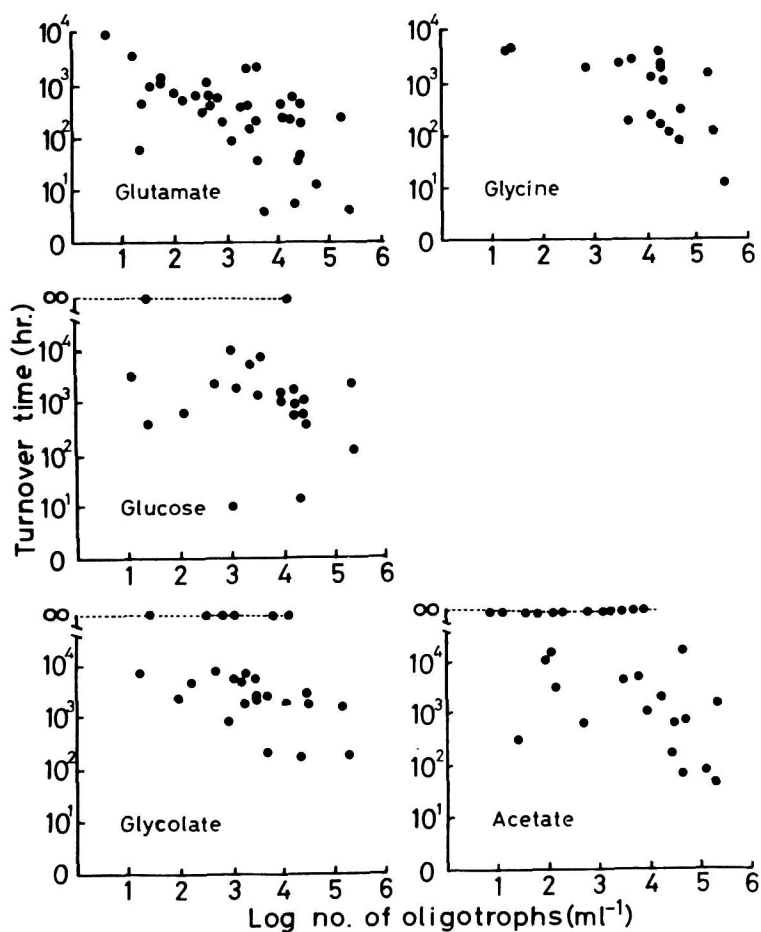


Fig. 4-4. Relationship between no. of oligotrophs (ml^{-1}) and turnover-times in 5 different substrates.

グルタミン酸とグリシンのフラックス (Flux rate)

各種海域で行った海水中の溶存態遊離アミノ酸 (DFAA, Dissolved Free Amino Acid) 量の測定結果 (Table 3-1), ならびに現場におけるグルタミン酸とグリシンのTt値から基質取り込み速度 (V_{glu} , V_{gly}) を算出した. 内湾域ではグリシンとグルタミン酸の濃度が高かったが, 外洋域ではLee and Bada (1975) の報告と同様, グリシンとセリンの濃度が高かった (Table 3-1). 外洋域のDFAAの合計量は100~200 nMであるのに対して, 内湾域ではその2倍以上の現存量を認めた. 化学分析によるグルタミン酸とグリシンの現存量 (S_n) と, ^{14}C -グルタミン酸と ^{14}C -グリシンを用いて算出した代謝回転時間 (Tt) から現場での取り込み速度 (V_{glu} , V_{gly}) を計算すると, 内湾域 (尾鷲湾, Stn. A) で V_{glu} が $17.5 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$, V_{gly} が $7.8 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$, 外洋域では V_{glu} が $0.03 \sim 0.45 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.16 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$), V_{gly} が $0.02 \sim 0.35 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.15 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$) であった. ^{14}C -MPN法から算出した従属栄養細菌1細胞当りに換算すると, 内湾域 (Stn. A) では V_{glu}/cell が, $3.2 \times 10^{-8} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$, 外洋域では V_{glu}/cell が $2.0 \times 10^{-9} \sim 1.9 \times 10^{-8} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ (av. $9.1 \times 10^{-9} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) であった.

考 察

本章では, 天然海水中の細菌群の基質取り込み活性を測定するために, Michaelis-Menten の酵素活性式を応用したParsons and Strickland (1962), Wright and Hobbie (1966) の方法を用いた. 本法を外洋域のような低栄養水域で用いた場合, 細菌群の基質取り込み活性は理論上の基質飽和型曲線 (双曲線) を描かず, 解析が困難になることが従来から報告されている (Vaccaro and Jannash, 1967; Hamilton and Preslan, 1970; Gocke, 1977; Gocke et al., 1981; etc.). その原因として様々なことが考えられる. 実験操作上の人為的な要因としては, 取り込み活性測定の際に添加する基質濃度がある. 有機物濃度の希薄な外洋域では基質濃度が特に重要な問題になる (Williams, 1973; Barvenik and

Malloy, 1979). Barvenik and Malloy (1979) はグリシンを用いた取り込み活性測定実験の際、添加するグリシンの濃度範囲を数nM～数10nMにすることで、Parsons and Strickland (1962)の方法による解析が可能になることを報告している。Ferguson and Sunda (1984) は、外洋海水試料への極微量の金属類や様々な有機物の混入が問題になることを指摘しており、塩酸処理を施したテフロン製のサンプルビン、ローブ、メッセンジャーによる採水方法 (clean technique) を用いた上で、添加基質濃度を下げる (0.01～7nM) と、アミノ酸の取り込み活性がMichaelis-Mentenの酵素活性モデルに従うとしている。海水中の溶存態遊離アミノ酸 (DFAA) の濃度が、生産性の高い沿岸域の表層で数100 nM、外洋域で100 nM前後 (Table 3-1, Lee and Bada, 1977; Mopper and Lindroth, 1982) であることを考慮すると、従属栄養活性測定の際に添加する基質濃度をナノモル (nM) に下げるのは当然のことかも知れない。本研究で海水試料の採取に用いたガラスボトルは、無リンの実験ガラス器具専用の洗剤 (Scat, 第一工業製薬社製) で洗浄した後、十分に再蒸留水でゆすぎ、電気炉で450 °C、1時間以上燃焼して使用した。従って、微量の金属や有機物の混入はないと考える。添加基質の濃度は、従来の数100 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲から下げ、数10 nMの濃度範囲で実験を行った (Table 4-1)。その結果、グルタミン酸とグリシンはMichaelis-Mentenの酵素活性モデルに従い、低基質濃度 (nM) での取り込み活性測定の重要性を確認した。

酢酸、グリコール酸とグルコースでは、基質濃度を下げても、解析が困難な場合が生じた。外洋域での1例をFig. 4-5に示す。最も特異な傾向を示したのは酢酸であった。海水中の細菌数が $10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以下の外洋域では、実験を行った試料の80 %が酢酸を全く取り込まなかった (Fig. 4-4)。Gillespie et al. (1976) も、南極海で行った酢酸の従属栄養活性の測定実験で同様の結果を得ている。Hamilton and Preslan (1970) は、グルタミン酸、グリシン、グルコース、グリコール酸などを含む10種類の基質を用いた外洋域 (太平洋、赤道付近) での取り込み活性測定実験から、グリコール酸、ガラクトースなどはMichaelis-Menten

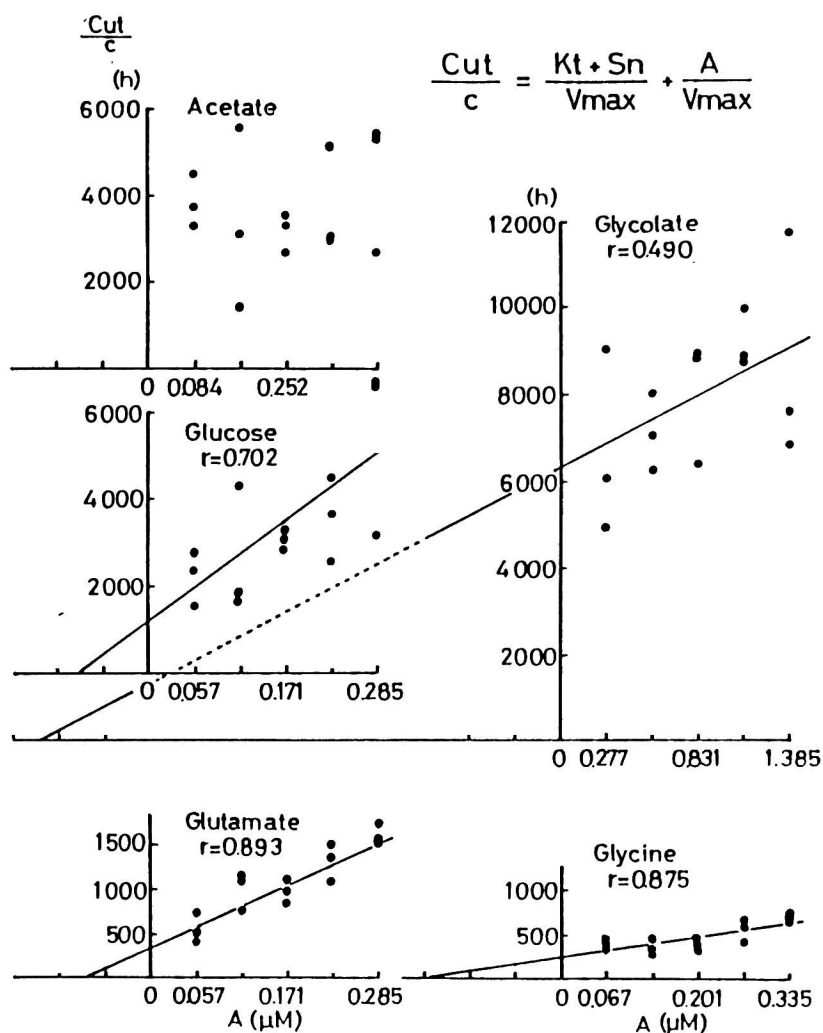


Fig. 4-5. Uptake kinetic patterns of acetate, glucose, glutamate, glycine and glycolate at Stn. D2 (Kumano-nada Sea) in September 1982. c, radioactivity assimilated by heterotrophs (dpm); A, added substrate concentrations (μM); C, 2.2×10^6 (dpm $\cdot \mu Ci^{-1}$); μ , amount of ^{14}C -labeled substrate added per sample tube (μCi); t, incubation time (h); r, correlation coefficient.

の酵素活性式に従わないが、グルタミン酸、グリシン、グルコースなどは従うと報告している。外洋域での基質取り込み活性が、Michaelis-Mentenのモデルに従わない別の要因として指摘されてきたのは、従属栄

養細菌群を構成する細菌の種の多様性である (Gocke, 1977; Vaccaro and Jannasch, 1967). しかし, 第3章で述べた様に外洋域は低栄養細菌群, 特に偏性低栄養細菌が優占することから, 細菌群の構成が多様であるとするよりも, むしろ生理的状态としては均質である. その結果, 外洋域では低栄養細菌の持つ高い基質特異性を反映して, 限られた基質について高い取り込み活性を示したと考える. つまり, 低栄養細菌群が優占する外洋域ではグリシン, セリンやグルタミン酸のような一部のアミノ酸が重要な基質となる.

酢酸, グルコースとグリコール酸では, ^{14}C -MPN法での利用細菌数が比較的多いにもかかわらず, 取り込み活性が低かったり, 全く取り込まなかったりする場合がある (南シナ海 Fig. 3-8, Table 4-4). グルコースは勿論のこと, 藻類の光合成代謝産物として海水中に放出されるグリコール酸は, 細菌に取り込まれた場合, その大半が呼吸により消費され, エネルギー源となる (Shah and Wright, 1974; Wright and Shah, 1975). 細菌の異化系酵素の大半が誘導性酵素であるから, 3~6 hの短時間の培養実験では, 十分な取り込みが起こらなかったのかもしれない. 酢酸も糖類の異化生成物と一致するから, カタボライト・リプレッションを受け, 4週間の長期培養 (^{14}C -MPN法) と異なり, 3~6 hの短時間培養 (基質取り込み実験) では取り込まれなかったと考える.

南極海域では, 培養温度に対する現場の取り込み活性の変化を調べた (Fig. 4-1, 4-2, と 4-3). Stns. 5, 6と 6-1では, 培養温度を20 °Cに上げると, いずれの基質も取り込み活性が低下した. これは, 南極海域で行われた他の実験でも報告されているように (Gillespie et al.,

1976; Morita, 1977; Hanson and Lowery, 1985; Jones and Morita, 1985; Kottmeier and Sullivan, 1988), ほとんどの細菌群が好冷性であることによると推定される. 現場水温が0 °Cの海水帯に位置するStn.

PI-3では, 10 °Cで最も活性が上がった. しかし, 他の測点と異なるのは, 現場水温 (0 °C) よりも20 °Cの方がより高い活性を示した点である. Hanson and Lowery (1985) は, 南極海で有機物濃度と培養温度が従属栄養細菌群に与える影響について調べ, 溶存態の有機物濃度を上げると,

0~5 °C よりも 15 °C の方が細菌の増殖速度が上がることを示した。Stn.

PI-3付近は、他の測点に比べ富栄養細菌や通性低栄養細菌が優占することから（第3章, Fig. 3-11）, Ice Algaeの増殖と溶出により、海水中の有機物濃度が上昇していると予想できる（Ackley et al., 1979）。現場水温（0 °C）よりも 20 °C で取り込み活性が上がったのは、Ice Algaeの増殖と海水中への溶出による有機物濃度の上昇に起因するのかも知れない。

Wright（1978）は、 $V_{max}/AODC$ 値（AODC, Acridine Orange Direct Count）が、天然水中の従属栄養細菌群の生理的状态や代謝活性を知るための良いパラメーターになるとしている。彼は、Massachusetts州の北東の沿岸から 14 km 沖合いまでの 9 定点の $V_{max}/AODC$ 値を比較し、貧栄養水域の海洋細菌は休眠状態（dormant）に入ること、飢餓環境に適応するとした Novitsky and Morita（1977）や Stevenson（1978）の考え方を支持する結論を導いた。細胞当りの取り込み活性（ $V_{max}/cell$ ）を算出する際、最も問題になるのは、どの様な計数法で得た細菌数を分母にするかということである（Simon, 1985）。AODC 値は、全細菌数を表し、生菌数や活性細菌数を反映しない（Taber and Neihof, 1982）。ここでは、 ^{14}C -MPN 法により得た従属栄養細菌数を使って $V_{max}/cell$ 値を算出した（Table 4-2, Table 4-3, と Table 4-5）。その結果、いずれの海域においても、酢酸を除くと、外洋域の細胞当りの最大基質取り込み速度（ $V_{max}/cell$ ）は、内湾水域の従属栄養細菌群の $V_{max}/cell$ に劣らないことを認めた。これは、外洋域の低栄養細菌群が、Hirsh et al.（1979）の仮定した "model oligotrophs" のように効率的な基質取り込み系を保持することを示すものと思われる。

現場海水中の取り込み活性（ V_{max} , T_t と $K_t + S_n$ ）と、同時に現場基質濃度（ S_n ）を測定すると、実際の基質の代謝速度（flux rate: $v = S_n/T_t$ ）の算出が可能になる。尾鷲湾（Stn. A）の場合、グルタミン酸とグリシンの V_{max} 値がそれぞれ、 $15.5 \sim 26.7 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ （av. $20.0 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ ）, $3.1 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。 v （flux rate）は、それぞれ $4.8 \sim 21.0 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ （av. $14.4 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ ）, $7.8 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。尾鷲湾に関しては、

1984年のアミノ酸の分析値と、1982年と1983年の取り込み活性の測定値を用いてflux rateを算出しているので、決定的なことは述べられないが、ここでの値を見る限り、尾鷲湾 (Stn. A) では、 V_{\max} の70~100 %の速度でグルタミン酸とグリシンの代謝が行われているようである。外洋域の場合、グルタミン酸の V_{\max} は、 $0.06 \sim 6.2 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $2.2 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$)、グリシンの V_{\max} は、 $0.05 \sim 1.2 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.5 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$)であった。この時のflux rate (v)は、グルタミン酸が $0.03 \sim 0.45 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.20 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$)、グリシンが $0.02 \sim 0.35 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$ (av. $0.18 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$)であり、それぞれ V_{\max} の9.1 %、43.0 %であった。Crawford et al. (1974) がNorth Carolina州のPamlico川の河口域で行った従属栄養活性の測定実験では、グルタミン酸のflux rateが V_{\max} の2.5~25.0 % (av. 10.9 %)、グリシンが平均26.0 %であった。グルタミン酸のflux rateの V_{\max} に対する比率が、尾鷲湾の比率に比べて低いのは、活性測定の際添加する基質濃度が現場水中の濃度に対して無視できない程度であり (本研究の約10倍)、そのため T_t が長くなり (Gocke et al., 1981)、その結果flux rateが実際よりも小さくなったことによると考える。

内湾域と異なり外洋域ではグルタミン酸とグリシンのflux rateが同程度 (約 $0.2 \text{ nM} \cdot \text{h}^{-1}$) であり、外洋域においてグリシンが重要な基質であることを明らかにした。海水中のグリシン濃度が高いのは、分子量が小さく、エネルギー効率が悪いために利用されずに残るとする考え方がある (Andrews and Williams, 1971)。しかし、この考え方は、グルタミン酸、グリシンのflux rateが同じことから否定できる。グリシンやセリンは、植物プランクトンの光合成初期産物のグリコール酸を基質とする光呼吸の過程で生じ、代謝産物として海水中に放出されると推定できる (横田, 1990)。従って、植物プランクトンの光合成を主要な有機物の供給源とする外洋域の従属栄養細菌群にとっては、グリシンやセリンが特に重要な存在となるのは当然といえよう。

なお、第5章で述べるように、外洋域の細菌細胞当りのグルタミン酸とグリシンのflux rate (それぞれ 2.2×10^{-4} と $2.0 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) が、分離した海洋細菌 (F-34 株) の低栄養増殖 (oligotro-

phic growth) 状態でのグルタミン酸とグリシン (25 nM) の基質取り込み速度 (5.4×10^{-4} と 2.5×10^{-4} $\text{pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) と近似した値を示したのは興味深いことである.

摘 要

(1) 外洋域では, グルタミン酸やグリシンに対する取り込み活性が高かった. 一方, 外洋海水試料の 80 % が酢酸をまったく取り込まず, 第3章で述べた低栄養細菌群の持つ高い基質特異性と一致した.

(2) 内湾域の取り込み活性は, いずれの基質も外洋域よりも高かった. ところが, 細菌細胞当り ($V_{\text{max}}/\text{cell}$) に換算すると, 外洋域のグルタミン酸やグリシンの取り込み活性は, 内湾域の細菌に優りこそするが, 劣るものではなかった.

(3) 現場水温が $-0.4 \sim 5^{\circ}\text{C}$ (夏期) の南極海では, 取り込み実験時の培養温度を 20°C に上げると, いずれの基質も取り込み活性が低下し, 細菌群が好冷性であることを認めた.

第5章 低栄養細菌の生理学的特性

緒 言

外洋域には、従来の高濃度有機物培地で捉えられない低栄養細菌が優占し、物質循環に果たす役割も大きいことを前章までに明らかにした。有機物濃度の希薄な外洋海水中に生息する従属栄養細菌群は、その生存戦略として、(1) 飢餓状態での生残 (Starvation-Survival) (Morita, 1982), (2) デトリタス等の粒子状物質の部分的な高濃度域に付着しての増殖 (Dawson et al., 1981), 及び (3) 低栄養環境に適応した増殖 (Oligotrophic Growth) (Ishida and Kadota, 1979; Ishida et al., 1980, 1986; Fuhrman and Azam, 1982; Eguchi and Ishida, 1990), のいずれかの生存形態をとるものと考えられる。ところが、今日までの外洋域の従属栄養細菌群に関する研究では、前2者が主に取り扱われ、外洋域における主要な生存形態とされてきた (Morita, 1986)。第3番目の生存戦略に関する研究は、実験方法の困難さも加わって極めて少なく、また (3) の重要性を主張するには不十分なものであった (Carlucci and Shimp, 1974; Mallory et al., 1977; Akagi et al., 1977)。前章までに、 ^{14}C -MPN法を用いることで、外洋水中では低栄養細菌群が優占することを見出し、(3) の戦略が重要であることの確信を得た。本章では、この細菌群の低栄養環境での生存戦略を、低栄養細菌の生理的特性から明らかにしようとした。

第1節 分類学的特性

細菌の生理学的実験や分類を行うとき、対象とする細菌の単離操作が重要になる。最も広く用いられているのは、細菌の寒天平板上でのコロニー形成能を利用した画線操作である。富栄養細菌や通性低栄養細菌は、多くの場合高濃度培地に増殖し、コロニーを形成するので画線での単離操作が可能である。しかし、偏性低栄養細菌は高濃度有機物培地に増殖

せず、寒天平板培地でコロニーを形成しないものが多いので、通常の方法による単離は困難である。そこで、外洋海水と同程度の低濃度液体培地を用いた希釈法による偏性低栄養細菌の純粋分離を試みた。通性低栄養細菌は寒天平板により単離を行い、常法により分類を行った。

材料及び方法

純粋分離

希釈法での偏性低栄養細菌の純粋分離の手順を以下に示した。

(1) 試料海水を接種し、3週間培養した ^{14}C -MPN法（第2章参照）の培養試験管（ ^{14}C - $\text{ST}10^{-1}$ 培地）の中で、培養液のdpm値が陽性であり、 $\text{ST}10^{-1}$ 培地への2次接種で濁るほど増殖せず、尚かつ、できるだけ希釈段階の高い試験管を選ぶ。

(2) 選び出した試験管の培養液を新たに調整した $\text{ST}10^{-4}$ 培地（10 ml）と $\text{ST}10^{-1}$ 培地（5 ml）にそれぞれ約0.1 mlずつ接種し、20℃で1～2週間培養する。

(3) 培養後、 $\text{ST}10^{-4}$ 培地から半量の5 mlを無菌的に採取し、DC-MPN法（第2章参照）で行ったのと同様にDAPI染色を行い、 $\text{ST}10^{-4}$ 培地中の細菌数を計数する。 $\text{ST}10^{-1}$ 培地は、濁りにより増殖の有無を検定する。

(4) $\text{ST}10^{-4}$ 培地で $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 以上に増殖し、 $\text{ST}10^{-1}$ 培地で濁りの生じなかった試験管については、更に(2)→(4)の操作を3、4回繰り返した。

(2)→(4)の操作を繰り返すことにより、偏性低栄養細菌の純粋分離を行った。

通性低栄養細菌の純粋分離は、 ^{14}C -MPN法の培養試験管のうち、 ^{14}C - $\text{ST}10^{-4}$ 培地と $\text{ST}10^{-1}$ 培地いずれの培地でも陽性と判定したものについて、 $\text{ST}10^{-4}$ 培地から $\text{ST}10^{-1}$ 寒天平板培地に画線して行った。また、上述の

(2)→(4)の操作途中で、 $\text{ST}10^{-1}$ 培地でも濁るほど増殖可能になった細菌は、その段階で通性低栄養細菌と同じ操作で純粋分離を行い、適応性通性低栄養細菌（AF0, Adapted Facultative Oligotrophs）とした。

偏性低栄養細菌9株（0-1～0-9株）のうち、0-3～0-7株の5株は、熊野灘 Stn. D（0.5 m層）から分離し、0-1株、0-2株と0-8株はそれぞれ高知沖 Stn. A2, Stn. A6 と Stn. C1の表層（0.5 m層）から、0-9株はStn. C1（125 m層）から分離した。通性低栄養細菌と適応性通性低栄養細菌の純粹分離した起源は、Table 5-1に示した。

基質利用性

ST10⁻⁴培地を10 ml入れた試験管に、¹⁴C-酢酸と¹⁴C-グリシンを別々に20 nCiずつ添加し、オートクレーブで滅菌処理した2種類の反応液を調整した。この2種類の反応液に、分離した偏性低栄養細菌9株、適応性通性低栄養細菌17株と通性低栄養細菌4株をそれぞれ接種し（10²～10³ cells・ml⁻¹）、20℃で2～3週間培養した。培養後、孔径0.22 μmのミリポアフィルターで培養液を濾過し、フィルターを乾燥後、液体シンチレーションカウンターでフィルター上に捕集した菌体の取り込んだ放射線量を測定した。

属レベルでの分類

適応性通性低栄養細菌17株と通性低栄養細菌17株の属レベルでの分類を常法（Simidu, 1985）にしたがって行った。

結 果

基質利用性

分離菌株の¹⁴C-グリシンと¹⁴C-酢酸の取り込み量（dpm値）をTable 5-2に示した。偏性低栄養細菌9株は、すべてグリシンを利用したが、酢酸を利用する菌株は9株中4株であった。適応性通性低栄養細菌17株と通性低栄養細菌17株は、実験を行った菌株すべてがグリシンと酢酸をともに利用することが可能であった。通性低栄養細菌については、4株の結果のみ代表値としてTable 5-2に示した。

Table 5-1. Origins of the isolated bacteria.

No. of strain		Origin	
Facultative oligotroph	F-1	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-3	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-5	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-7	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-8	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-9	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-12	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-13	Owase Bay (Stn. A)	0.5 m depth
	F-15	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-16	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-17	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-18	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-20	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-21	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	F-34	Uragami Bay (Stn. U2)	0.5 m depth
	F-206	Uragami Bay (Stn. U2)	0.5 m depth
	F-211	Uragami Bay (Stn. U2)	0.5 m depth
Adapted facultative oligotroph	AF-1	Off Kochi (Stn. C1)	0.5 m depth
	AF-2	Off Kochi (Stn. B1)	0.5 m depth
	AF-3	Off Kochi (Stn. C1)	0.5 m depth
	AF-4	Off Kochi (Stn. C1)	0.5 m depth
	AF-5	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-6	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-8	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-9	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-11	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-12	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-13	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-14	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-15	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-16	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-17	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-18	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth
	AF-20	Kumano-nada sea (Stn. D)	0.5 m depth

Table 5-2. Uptake of acetate (OAc) and glycine (Gly) as ^{14}C -substrate in ^{14}C -ST10 $^{-4}$ media by obligate oligotrophs, adapted facultative oligotrophs, and facultative oligotrophs isolated from various sea-waters.

	No. of strain	Uptake of ^{14}C -substrates (dpm)	
		OAc	Gly
Obligate oligotroph	O-1	448	1301
	O-2	60	1337
	O-3	69	1544
	O-4	300	1529
	O-5	170	1410
	O-6	65	1425
	O-7	725	1587
	O-8	79	1194
	O-9	66	1218
Adapted facultative oligotroph	AF-1	3345	3400
	AF-2	2069	3377
	AF-3	8050	3731
	AF-4	2347	1818
	AF-5	12219	6671
	AF-6	2383	2220
	AF-8	2944	1609
	AF-9	11205	5812
	AF-11	5299	2423
	AF-12	7898	3649
	AF-13	4291	2970
	AF-14	12057	1308
	AF-15	6578	5285
Facultative oligotroph	AF-16	6464	3063
	AF-17	9322	1803
	AF-18	2785	1532
	AF-20	13642	5307
	F-1	841	2104
	F-34	1795	2016
	F-206	2210	1888
	F-211	805	1940

Origins of the isolates were listed in Table 5-1.

属レベルでの分類

通性低栄養細菌と適応性通性低栄養細菌は、常法に従って属レベルまでの分類を行った (Table 5-3)。通性低栄養細菌は *Vibrio-Aeromonas* 群のほか、*Flavobacterium* 属、*Pseudomonas-Alteromonas* 群、*Alcaligenes* 属など細菌相が多様であったのに対し、適応性通性低栄養細菌は17株のうち13株が *Pseudomonas-Alteromonas* 群であった。偏性低栄養細菌は、寒天平板にコロニーを作れず低濃度液体培地のみに増殖し、高濃度培地に増殖できないので、常法に従った分類はできなかった。

Table 5-3. Taxonomic composition (%) of facultative (F0) and adapted facultative (AF0) oligotrophs.

	F0	AF0
<i>Pseudomonas-Alteromonas</i>	19.0	76.4
<i>Vibrio-Aeromonas</i>	33.3	11.8
<i>Alcaligenes</i>	4.1	11.8
<i>Flavobacterium</i>	28.6	0
<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	14.3	0
	100.0	100.0

Origins of isolates were listed in Table 5-1.

考 察

Ishida and Kadota (1981) は、琵琶湖北湖から分離した18株の偏性低栄養細菌の基質利用性を調べた結果、グルタミン酸、グリシン、セリン、グリコール酸等をよく利用する反面、酢酸、プロリン、ロイシンに対する利用性が非常に低いことを指摘している。本研究で分離した偏性低栄養細菌9株も、グリシンをよく利用するのに対し、酢酸の利用性が低く、

淡水性の偏性低栄養細菌と似た基質利用性を示した。 ^{14}C -MPN法による計数実験の結果、偏性低栄養細菌の優勢な外洋域ではグリシン利用菌が多いのに対して、酢酸利用菌が少ないことを述べたが（第3章）、このことは分離した偏性低栄養細菌の基質利用性からも裏付けることができた。

希釈法により偏性低栄養細菌の純粹分離を試みた。ST10 $^{-4}$ 培地へ数回植え継ぎを繰り返す過程で、29株中20株が高濃度有機物培地（ST10 $^{-1}$ 培地）で増殖して濁りを見せるようになった。寒天のみの平板培地等を用いて分離した外洋域の従属栄養細菌が、低濃度培地での植え継ぎを繰り返すうちに、有機物濃度の高い寒天平板でのコロニー形成が可能になるという報告は多い（Colwell et al., 1985; Grimes et al., 1986; Simidu et al., 1986; Carlucci et al., 1986）。逆に、Höfle（1983）は、*Cytophaga johnsonae* のグルコース制限下での長期連続培養実験（ケモスタット、 $D=0.03\text{ h}^{-1}$ ）から、本菌が生きているがコロニー形成能を失った生理状態に陥ることを報告している。従って、 ^{14}C -MPN法により計数した偏性低栄養細菌の一部が、外洋水に適応した通性低栄養細菌によって構成されている可能性はある。

分離した通性低栄養細菌は、*Vibrio*-*Aeromonas*群を中心に比較的多様な細菌相を示したが、適応性通性低栄養細菌は、*Pseudomonas*-*Alteromonas*群がその70 %以上を占めた。Akagi et al.（1980）が、外洋域（南西諸島付近）で行った海洋細菌の分類実験でも本研究と同様の傾向を認めている。彼らは、ヌクレオポアフィルターにより外洋水から細菌を集め、寒天平板培地（有機炭素量は $16.8\text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$ ）を用いて分離した結果、低栄養細菌（本研究の定義では通性低栄養細菌に相当する）では*Pseudomonas*属が優占し、富栄養細菌（有機炭素量が $2.074\text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$ の寒天平板培地で分離）では*Vibrio*属が優占したと報告している。

第2節 高濃度有機物環境、低濃度有機物環境、及び飢餓環境における低栄養細菌の増殖特性

低栄養環境における海洋細菌の飢餓や増殖などの生理学的な研究は、もっぱら高濃度有機物環境で増殖した細胞中心に行われてきた

(Novitsky and Morita, 1977 and 1978; Kurath and Morita, 1983; Humphrey et al., 1983; Nissen et al., 1984; Davis and Robb, 1985; Nyström et al., 1986; Nyström and Kjelleberg, 1987; etc.). すなわち、高濃度培地で増殖した海洋細菌を人工海水のみの飢餓環境に移し、そのときの生理的变化から、外洋域などでの細菌の状態を知ろうとする手法である。外洋海水が有機物に富み、生息している従属栄養細菌群の大半が富栄養細菌によって優占されているとするなら、この手法も有効であろう。しかし、外洋域は、有機物濃度が希薄であり、その環境に適応した低栄養細菌が優占している。従って、外洋域での従属栄養細菌群の真の生存状態を理解し、その生存戦略を解明するためには、高濃度培地と飢餓培地のみを用いた実験系では不十分である。ここでは、通性低栄養細菌をモデル細菌として、様々な有機物濃度環境及び飢餓環境での生菌数、総菌数、初期取り込み速度や細胞体積の変化などからその環境での生理状態を調べ、外洋域における低栄養細菌の生存戦略を明らかにしようとした。

材料及び方法

供試菌株

海洋から分離した通性低栄養細菌（グラム陰性菌）のF-34株、F-206株とF-211株の3株を供試菌として用いた。分離起源はTable 5-1に示したとおりである。この通性低栄養細菌3株の他に対照として、浦神湾（Stn. U2）の底泥から分離した富栄養細菌UB-33株（グラム陰性菌）とE. coli (IFO No. 3301, K12株)を供試菌として用いた。

培地

高濃度有機物培地（H培地）と低濃度有機物培地（L培地）を用いて細菌の培養を行った。H培地の組成は、トリプチケースペプトン（BBL）0.5 g、酵母エキス0.3 g、 K_2HPO_4 0.1 gを人工海水1 lに添加して、調製した。L培地は、H培地を人工海水で1,000倍に希釈して調製した。人工海水は、Mårdér et al.（1985）のNSS（nine salt solution）を用いた。人工海水（NSS）の成分は、NaCl 17.6 g； Na_2SO_4 1.47 g； $NaHCO_3$ 0.08 g；KCl 0.25 g；KBr 0.04 g； $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.87 g； $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.41 g； $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01 g； H_3BO_3 0.01 g 以上9種類の無機塩類を再蒸留水（蒸留水をNaOHで弱アルカリ性にし、 $KMnO_4$ を微量添加して再蒸留した）1,000 lに溶解し、pH 7.8に調製した。有機物を全く添加しない飢餓培地には、この人工海水のみを用いた。使用した培地はすべてオートクレーブ（120℃、15分）滅菌した後、pH 7.8に無菌的に再調整して使用した。なお、実験に使用したガラス器具は、すべて専用洗剤（Scat、第一工業製薬）で十分に洗浄し、再蒸留水でゆすいだ後、450℃で1時間以上燃焼した。

培養と飢餓の条件

高濃度有機物環境での増殖（EG, Eutrophic Growth）

継代培養を行っている寒天斜面培地（H培地）から1白金耳とり、滅菌人工海水（NSS）に懸濁する。この懸濁液-①約 0.1 mlを100 mlのH培地に接種し、20℃で12時間振とう培養（100 rpm）を行い前培養とした。この前培養液を、接種時の菌濃度が約 $10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ になるように別のH培地に接種し、20℃で12時間振とう培養（100 rpm）を行い、得られた後期対数増殖期の細胞を富栄養状態の細胞、EG-cellとした。

低濃度有機物環境での増殖（OG, Oligotrophic Growth）

上述の懸濁液-①から約0.01 mlを100 mlのL培地に接種し、20℃で24～72時間静置培養を行う。この培養液から再び約0.01 mlを別の新しいL培地（100 ml）に接種し、20℃で24～72時間静置培養を行う。このL培地に

よる静置状態での継代培養を3～4回繰り返し行った。L培地で継代培養した細菌を、菌濃度が約 $10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ になるように適当量のL培地に接種し、20℃で24～48時間静置培養を行い、得られる後期対数増殖期の細胞を低栄養状態の細胞、OG-cellとした。

飢餓環境 (S, Starvation)

EG→S (高濃度培地で増殖した細菌を飢餓環境に移した場合)

H培地で増殖しているEG-cell ($\text{ca. } 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) を遠心分離操作 ($6,500 \times g$, 5 min) によって集菌し、滅菌人工海水で2度遠心洗浄を行い、滅菌人工海水のみの飢餓培地に一定の菌量 ($10^3 \sim 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) を懸濁した。

OG→S (低濃度培地で増殖した細菌を飢餓環境に移した場合)

L培地で増殖しているOG-cell ($\text{ca. } 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) を0.2 μm のヌクレオポアフィルター (Nucleopore 社製) で無菌的に、ゆるやかに吸引濾過して集菌し、滅菌人工海水で充分洗浄した後、滅菌人工海水に懸濁した。この懸濁液 ($\text{ca. } 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) から飢餓培地へ適当量移した。

抗生物質の添加

増殖実験では、オートクレーブで滅菌処理した各培地に無菌濾過した抗生物質を添加した後、各細菌を接種し、培養して生菌数の経時変化を調べた。使用した抗生物質は、グラム陰性菌のタンパク合成を阻害するクロラムフェニコールとDNA合成を阻害するナリジキシン酸の2種類である。クロラムフェニコールとナリジキシン酸は、それぞれ最終濃度が20 $\mu\text{g/ml}$ と50 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した。

生菌数の計数

生菌数の計数は、コロニー計数法で行った。必要に応じて培養液1 mlを採取し、滅菌人工海水で適当に10倍希釈を行い、塗抹または混釈により寒天平板培地に接種した。使用した寒天平板培地は、H培地に寒天 (Bacto-Agar, Difco社製) を最終濃度1.5 %になるように添加したもので

ある。総菌数の計数は、必要に応じて第2章（材料及び方法）と同様、DAPI染色法により行った。

³H-チミジンの取り込み活性の測定

細菌のDNA合成活性の測定は、[methyl-³H]-Thymidine（83 Ci・mmol⁻¹，Amersham社）の5%冷トリクロル酢酸（TCA）不溶性画分への取り込みにより測定した。適当な時間に培養液から試料をスクリーキャップ付試験管に無菌的に5 ml採取し、³H-チミジンを添加した（最終濃度5 nM）後、20℃、暗所で20分間培養した。培養後、試料を1分間氷冷し、同じく氷冷した10 % TCA溶液を等量の5 ml培養試験管に加え（最終濃度5 %），更に5分間氷冷した後、0.22 μmのミリポアフィルター上に濾過した。フィルターは、2 mlの氷冷5 % TCA溶液で5回以上洗浄し、乾燥した後、トルエン系液体シンチレーターを5 ml入れたバイアルビンに移し、フィルター上の放射線量を液体シンチレーションカウンター（Packard Tri-CARB Model 2425）で測定した。実験はすべて2本立（duplicate）で行った。また、試料 5 mlに37 %ホルムアルデヒドを³H-チミジンと同時に添加して（最終濃度4 %），同様の実験操作を行ったものを空試験値とした。

基質取り込み活性の測定

様々な有機物濃度環境における細菌の基質取り込み活性の指標として、初期取り込み速度を測定した。F-34株とF-206株は、OG-cellの他に、EG-cellを人工海水のみの飢餓培地に移して24時間経過した〔以下、EG→S（24h）とする〕飢餓細胞について、UB-33株とE. coli K12株はEG→S（24h）の飢餓細胞について、それぞれ初期取り込み速度を測定した。

種々の培養状態の菌液5 mlを無菌的に試験管にとり、各種¹⁴C-基質を適当な濃度（最終濃度25～250 nM，7.5 mM）になるように添加した。初期取り込み速度測定中のタンパク合成を抑制するため、¹⁴C-基質添加と同時にクロラムフェニコールも試料に添加した（最終濃度20 μg・ml⁻¹）。¹⁴C-基質を添加後、適当な時間（7，15，30，45 sec）に無菌的

に試料を1 ml採取し、直ちに0.22 μ mミリポアフィルター上に濾過して、基質の取り込み反応を停止させた。濾過の終了したフィルターは、滅菌人工海水5 mlで2回以上洗浄後、乾燥し、 ^3H -チミジンの取り込み実験と同様にしてフィルター上の放射線量を測定した。空試験値も ^3H -チミジンの取り込み実験と同様にして算出した。用いた基質の種類は、 ^{14}C -グルタミン酸、 ^{14}C -グリシン、 ^{14}C -酢酸、 ^{14}C -グルコースと ^{14}C -グリコール酸（比活性等は第2章 材料及び方法参照）に加えて、L- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -ロイシン（337.1 mCi \cdot mmol $^{-1}$ ）、L- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -イソロイシン（326.0 mCi \cdot mmol $^{-1}$ ）とL- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -プロリン（268.1 mCi \cdot mmol $^{-1}$ ）の合計8種類である。すべての測定実験は20℃で行い、2本立てで2回以上測定した。

走査型電子顕微鏡（SEM）による細胞の形態観察と細胞体積の測定

細胞体積の測定は、走査型電子顕微鏡（JSM-T200型、日本電子社製）による撮影写真から算出した。DAPI染色用の試料と同じく70%グルタルアルデヒド（最終濃度0.5～1 %）で固定した試料を適量0.2 μ mヌクレオポアフィルター上に濾過捕集し、エタノール系列（50～100 %）で脱水後、最終的に酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥（IJPD-5型、日本電子社製）を行った。臨界点乾燥を行った試料に、金（Au）イオン蒸着（JFC-1100型、日本電子社製）を行い、SEMで観察、撮影した。細胞体積（V）は、細胞を円柱の両側に半球のついた形に近似して、菌体の長軸（L）と短軸（W）をSEM像から計測し、 $V = (\pi/4) \times W^2 \times (L - W/3)$ の式から算出した（Bratbak, 1985）。球菌状の細胞の場合は、L=Wとなる。

透過型電子顕微鏡（TEM）による観察

各培養液を遠心集菌して試料とした。ただし、0G-cellの場合、L-培地を用いて大量（5～10 l）に培養を行い、前述のように0.22 μ mのヌクレオポアフィルターによる濾過操作で集菌後、50 mlの滅菌人工海水に懸濁し、その懸濁液から遠心集菌した。遠心集菌した菌液の沈査に2.0 %グルタルアルデヒドを加えて攪はんし、室温で1時間固定した後、1.0 %四酸化オスミウムを加えて室温で2時間後固定を行った。グルタル

アルデヒド-四酸化オスミウムの二重固定を行った試料を遠心洗浄し、1.5~2.0 % 寒天に包埋し、約1 mm²の細片に切り取った。この寒天に包埋した菌体をエタノール系列（50~100 %）で脱水し、プロピレンオキサイドで置換後、エポキシ系樹脂に包埋した。試料の超薄切片は、ダイヤモンドナイフで作成し、0.5 % 酢酸ウランとReynoldsのクエン酸鉛法で電子染色を行い、TEM（BIOsysTEM JEM-1200EXII, 日本電子社製）で観察し、撮影を行った。

結 果

生菌数の経時変化

通性低栄養細菌（F-34株）を高濃度有機物環境（H培地, ca. 300 mgC/l）で増殖させた場合（EG-cell）、EGから飢餓環境（S）へ移した場合、また低濃度有機物環境（L培地, ca. 0.3 mgC/l）で増殖させた場合（OG-cell）、OGからSへ移した場合の4つの異なる環境での生菌数（Fig. 5-1）の経時変化を調べた。また、それぞれの場合における、クロラムフェニコールとナリジキシン酸の添加による細菌数の変化についても併せて調べた。EG-cellは、典型的なバッチ培養の増殖曲線を示し、対数増殖期の増殖速度は1.33 h⁻¹であった。EG-cellの場合、クロラムフェニコール（最終濃度20 μg/ml）またはナリジキシン酸（最終濃度50 μg/ml）のいずれかを添加すると、24時間目以降、生菌数が1/100以下になった（Fig. 5-1a）。OG-cellの対数増殖期の増殖速度は、0.54 h⁻¹と遅くなるが、抗生物質に対する感受性はEG-cellと似た傾向を示した（Fig. 5-1b）。EG→Sでは、飢餓環境に移して12時間後には細菌数が4~5倍に増えた。この飢餓の場合、タンパク合成阻害剤であるクロラムフェニコールを添加すると、EGやOGと同様に生菌数が減少した。しかし、DNA合成阻害剤であるナリジキシン酸を添加しても阻害されず生菌数は増加した（Fig. 5-1c）。OG→Sの場合もEG→Sと同様に生菌数が増加した。しかし、前記2種の抗生物質によって増殖が阻害され、EG→SよりもEGやOGと似ていた（Fig. 5-1d）。EG-cellを飢餓環境に移す実験は、F-34株以外の通

性低栄養細菌（F-206株とF-211株）についても行った（Fig. 5-2）。

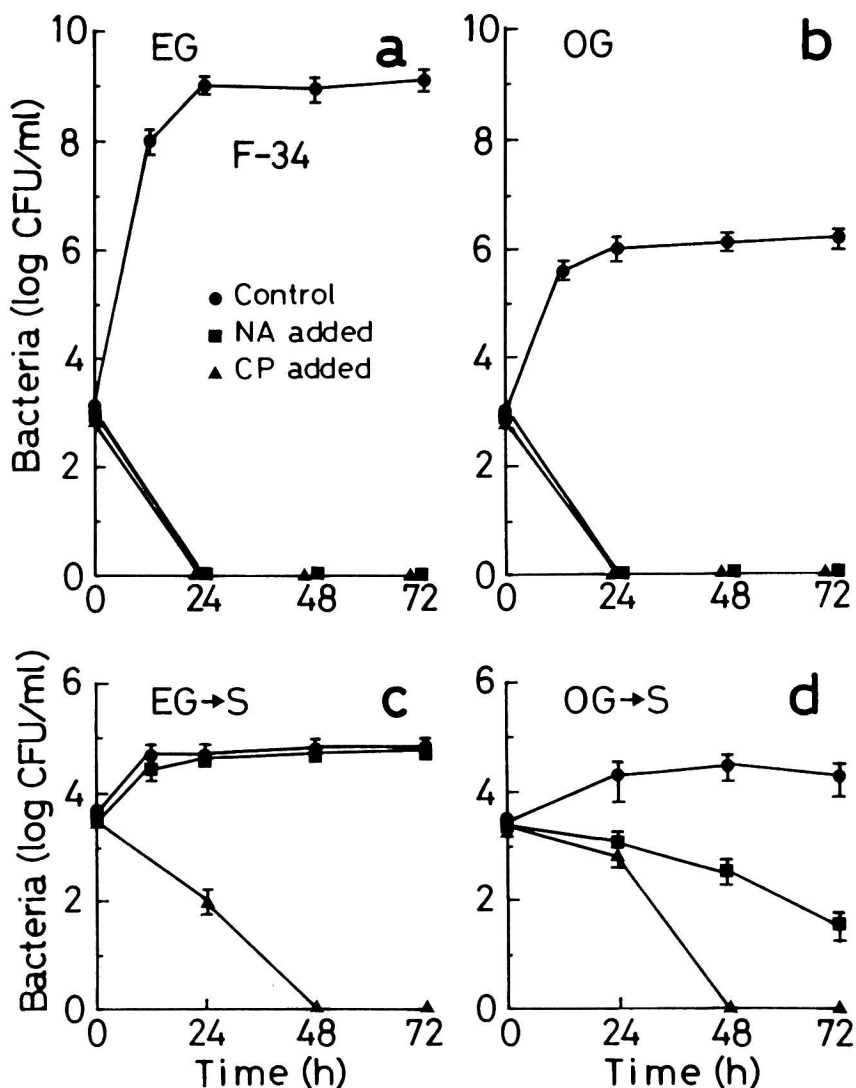


Fig. 5-1. Changes in the number of viable cells of a facultative oligotroph (F-34; Gram negative) under various nutritional conditions. (a), eutrophic growth (EG); (b), oligotrophic growth (OG); (c), starvation from EG (EG→S); (d), starvation from OG (OG→S). Viability was determined by plate counts. Each point is the average of replicate (6 plates) measurements with standard deviation. CFU, colony forming unit. NA, nalidixic acid (final conc. $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); CP, chloramphenicol (final conc. $20 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). See the text for the details.

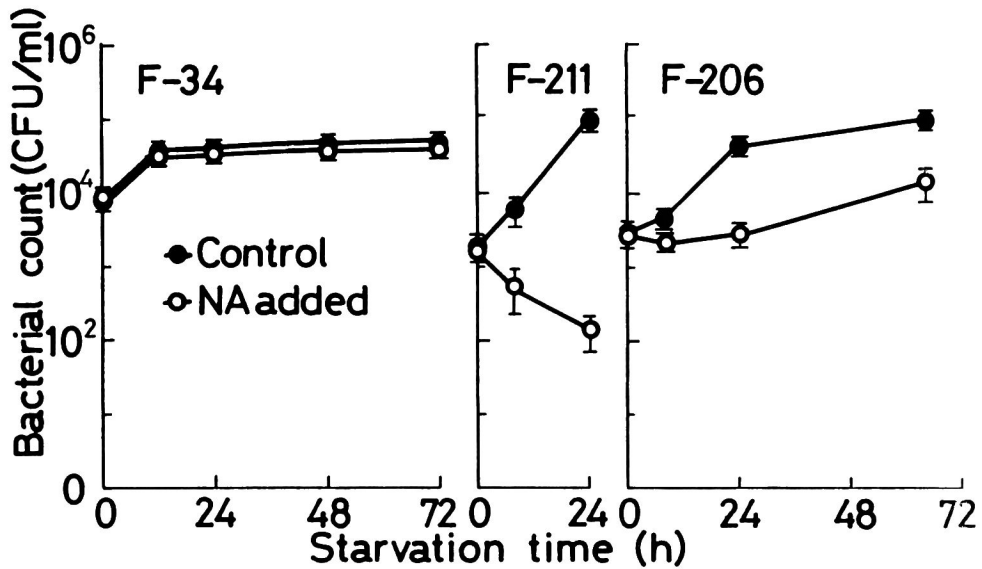


Fig. 5-2. Starvation patterns of three facultative oligotrophs (F-34, F-206 and F-211). All cells were grown in H-medium, then starved in the artificial seawater.

F-34株と同様、F-206株とF-211株共に、EG→Sで数倍から約10倍に生菌数が増加した。EG→Sでのナリキシシン酸の添加効果は、F-206株とF-211株で異なった。F-211株の生菌数は、DNA合成を阻害すると減少したが、F-206株はやや増加傾向を示した。

F-34株のOG→Sでの生菌数の経時変化については、さらに飢餓環境に移したときの細胞数を $7.0 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と $7.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に変えて実験を行った。細菌数が $7.0 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ の場合は、飢餓環境に移して24時間後に元の約4倍、72時間後にはほぼ10倍の生菌数に達した。ところが、実験開始時の菌濃度を $7.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に上げると、72時間経過後も生菌数に変動はなかった (Fig. 5-3)。一方、EG→Sの場合は、Novitsky and Morita (1978) の結果と同様に、菌濃度を変えても24時間後には常に元の菌数の数倍に生菌数が増加した ($9.4 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1} \rightarrow 2.6 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$, $6.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1} \rightarrow 2.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)。

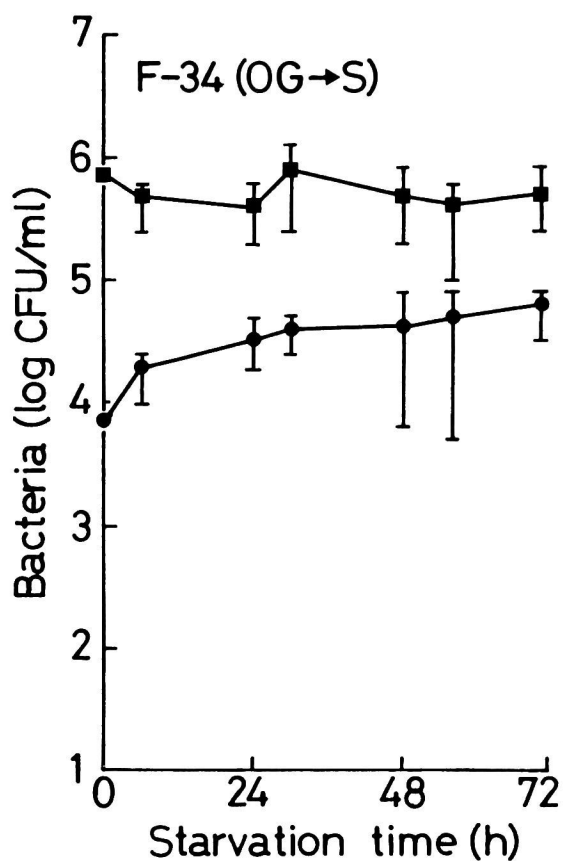


Fig. 5-3. Changes in the number of viable cells (F-34) during starvation depending on the difference of the initial cell densities (7.0×10^3 and $7.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$). All cells were grown in L-medium (OG-cells). See the text for the details.

富栄養細菌UB-33株は、H培地中では通常の増殖曲線を示した (Fig. 5-4b) が、L培地中では、増殖できなかった (Fig. 5-4a)。UB-33株のEG cellを飢餓環境に移したときの生菌数の経時変化を相対的 (%) に示したのがFig. 5-5である (初発菌濃度は $5.4 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)。72時間後には、元の約30 %まで生菌数が低下し、3週間後には1/100以下になった。

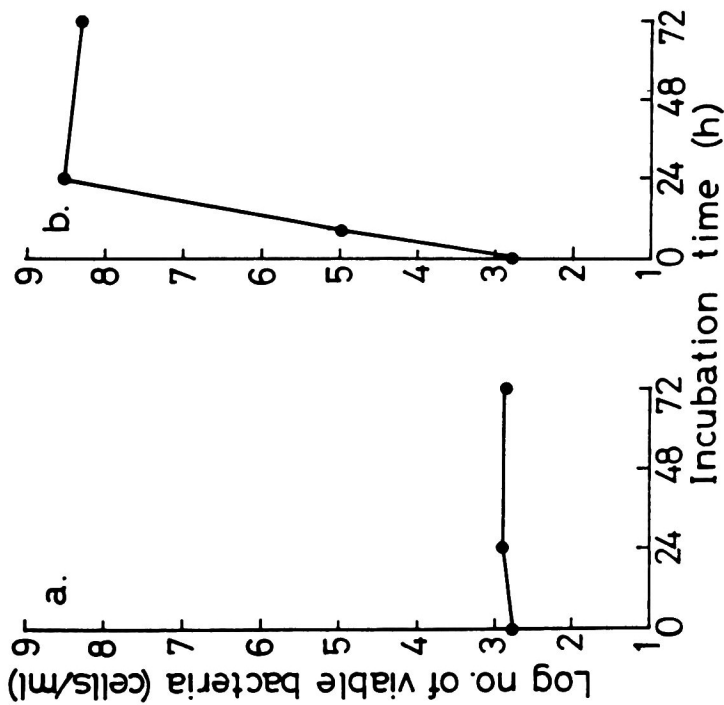


Fig. 5-4. Growth curves of an eutroph (UB-33) in L-medium (a) and H-medium (b). Viability was determined by plate counts. Each point is the average of replicate (6 plates) measurements.

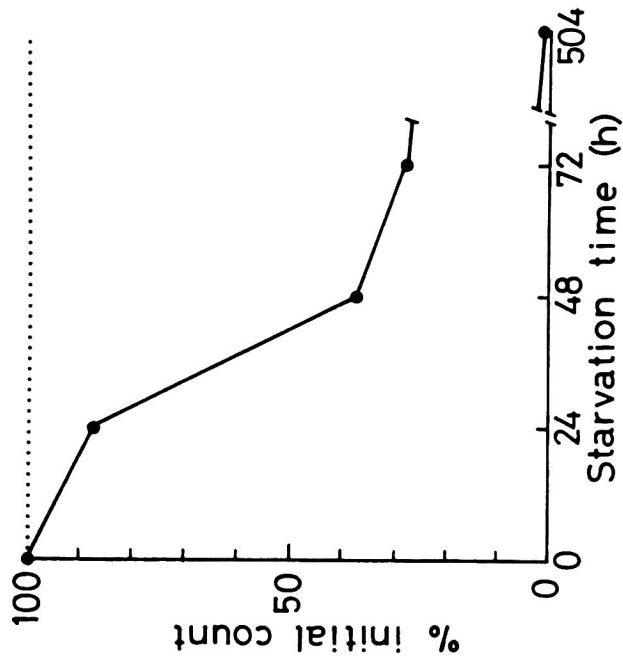


Fig. 5-5. Viability of an eutroph (UB-33) during starvation. Viability was determined by plate counts and expressed as a percentage of the initial count.

飢餓環境におけるDNA合成活性の経時変化

飢餓環境での細菌のDNA合成活性を調べるために、 ^3H -チミジンの5 % TCA不溶性画分への取り込み速度を測定した。通性低栄養細菌 (F-34株) のEG→SとOG→Sにおける初発菌濃度を、 $10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ と $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ にしたときの、それぞれのDNA合成活性の経時変化をFig. 5-6に示した。飢餓環境に移して3時間経過した時の細菌細胞当りの ^3H -チミジンの取り込み速度を1.0として、その後の取り込み速度を相対的に数値化した。

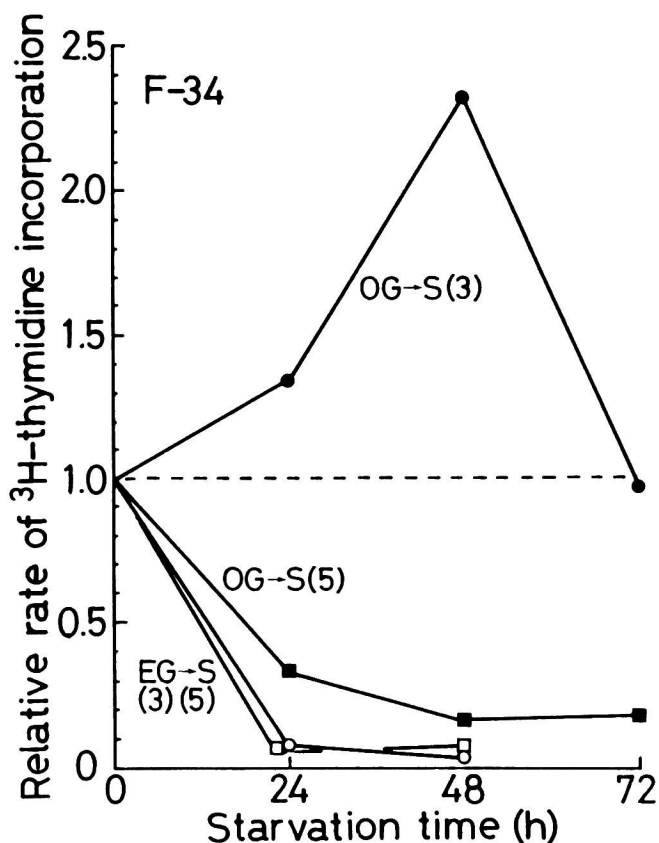


Fig. 5-6. Relative changes in DNA synthesis of OG-cells and EG-cells (F-34) depending on the difference of initial cell densities (10^3 and $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$) during starvation. The rates of DNA synthesis were determined from the slopes of the linear incorporation graphs of methyl [^3H] thymidine for 20 min.

EG→Sの場合、初発細菌濃度に関係なく、24時間経過後の³H-チミジン取り込み速度は飢餓環境に移して3時間経過時の約10 %に低下した。OG→Sの場合の³H-チミジン取り込み速度は初発菌濃度によって異なった。菌濃度を $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ にすると、EG→Sと同様にDNA合成活性が徐々に低下したが、菌濃度を $10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ に下げると、24時間後で元の1.3倍、48時間後で2.4倍に上がり、72時間後でも3時間経過時と同程度のDNA合成活性を認めた。

基質取り込み活性

EG-cellを飢餓環境に移して24時間経過した場合の通性低栄養細菌（F-34株とF-206株）の初期基質取り込み速度と富栄養細菌（UB-33株とE. coli K12株）のそれを比較すると、高濃度域（7.5 mM）では富栄養細菌が速くなった（Table 5-4）が、低濃度域（25 nM）では通性低栄養細菌の方が速くなった（Table 5-5）。同じ通性低栄養細菌でも、OG-cellとEG→S（24h）の細胞は、更に異なる取り込み活性を示した。F-34株の場合、OG-cellの初期取り込み速度は、EG→S（24h）の細胞と比べると、グルタミン酸で2倍、グリシンで約6倍、プロリンやロイシンなどは10倍以上速くなった。OG-cellとEG→S（24h）の細胞で初期取り込み速度に変化がなかったのはグルコースであり、いずれも同じグルコース取り込み系を持つようである（Table 5-5）。

Table 5-4. Initial uptake rate of glutamate at high concentration (7.5 mM).

	Initial uptake rate ($\times 10^{-3} \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$)		
	F-34	UB-33	E. coli
Glu (7.5 mM)	0.4	1.1	2.1

All cells were grown in H media (ca. $300 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$), then starved for 24 h in artificial seawater (F-34 and UB-33) or physiological salt solution (E. coli).

Table 5-5. Initial uptake rates of various substrates at a low concentration (25 nM).

		Initial uptake rate ($\times 10^{-9}$ pmol \cdot s $^{-1}$ \cdot cell $^{-1}$)						
Strain no.		Glu	Gly	Pro	Leu	Ile	Glc	OAc
F-34	OG	6.2	2.9	9.3	9.8	6.7	0.5	4.4
	EG \rightarrow S	3.1	0.5	0.7	0.8	0.6	0.5	0.3
F-206	OG	10.3	-	-	-	-	-	-
	EG \rightarrow S	3.8	-	-	-	-	-	-
UB-33	EG \rightarrow S	1.1	0.4	-	-	-	0.2	0.3
<i>E. coli</i>	EG \rightarrow S	0.04	-	-	-	-	-	-

-, no data; OG, cells grown in L medium (ca. 0.3 mgC \cdot l $^{-1}$); EG \rightarrow S, cells grown in H medium (ca. 300 mgC \cdot l $^{-1}$) then starved for 24 h in artificial seawater or physiological salt solution (*E. coli*); Glu, glutamate; Gly, glycine; Pro, proline; Leu, leucine; Ile, iso-leucine; Glc, glucose; OAc, acetate.

走査型電子顕微鏡 (SEM) による細胞の形態観察

F-34株のEG-cellとEG \rightarrow S (24h) の細胞の形態をSEMによって観察したところ, 前者が桿菌状であるのに比べて後者が球菌状になり, 小型化しているのがわかった (Fig. 5-7c,d). 同じF-34株でも, 低濃度有機物環境で増殖したOG-cellとOG \rightarrow S (24h) の細胞では, EG \rightarrow S (24h) の場合ほど明確な形態変化は観察できず, 桿菌状を保っていた (Fig. 5-8b). しかし, OG-cellを飢餓環境で3週間以上放置すると小型化し, 球菌状になった (Fig. 5-8c).

UB-33株のEG \rightarrow S (72h) の細胞は, 正常なEG-cellと比べるとかなり変形し, 飢餓環境で溶菌し始めているようであった (Fig. 5-9b). 3週間後には, ほとんど正常な細胞らしいものは認められなかった (Fig. 5-9c).

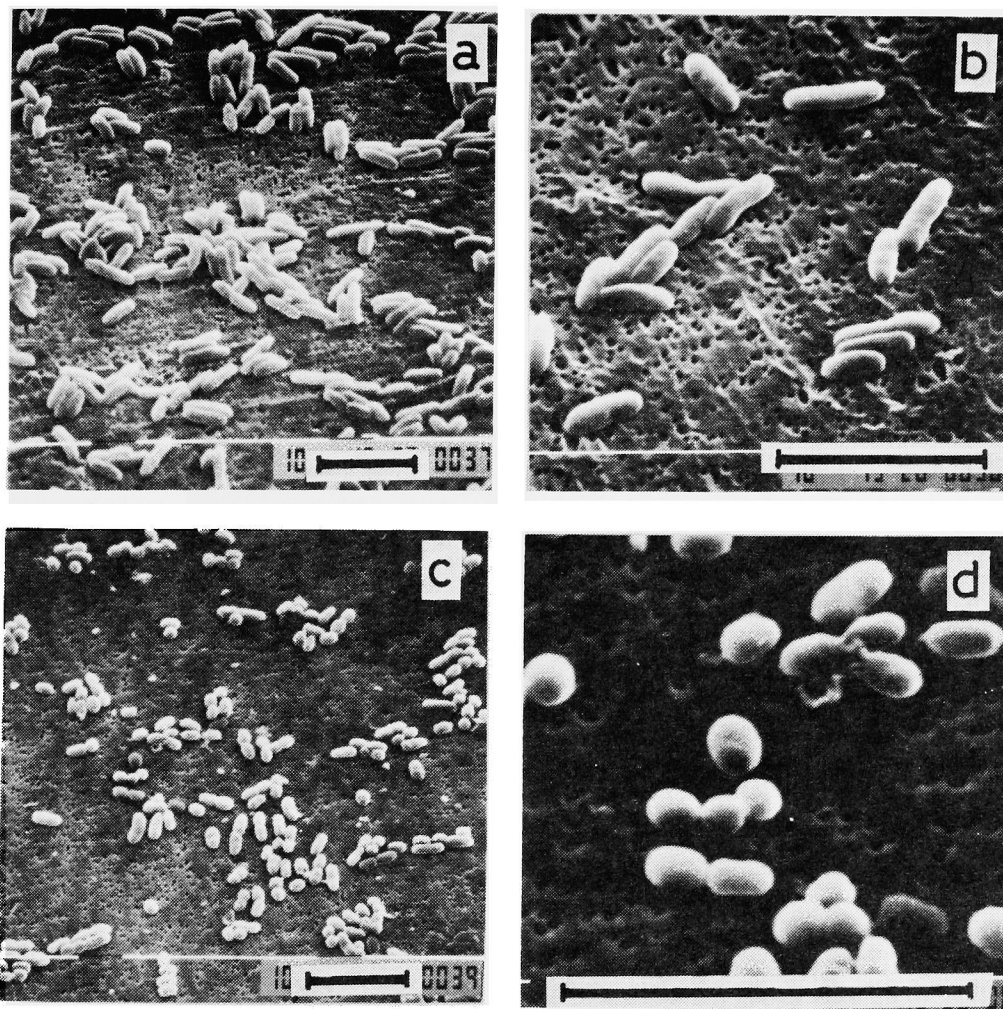


Fig. 5-7. Scanning electron micrographs of F-34 cells under nutrient rich condition (H-medium) and energy free starvation. (a) and (b). EG-cells; (c) and (d). EG→S(24h) cells. Bars represent 5 μ m.

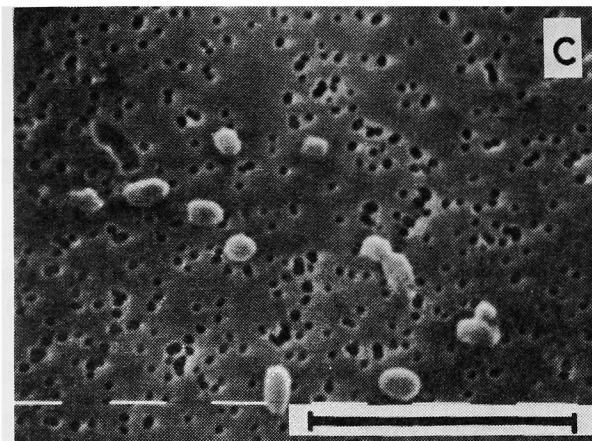
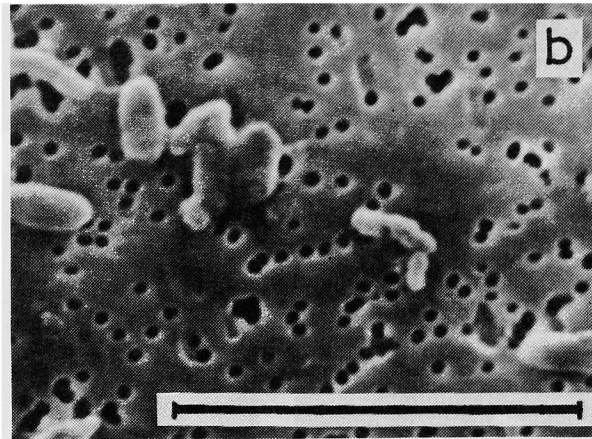
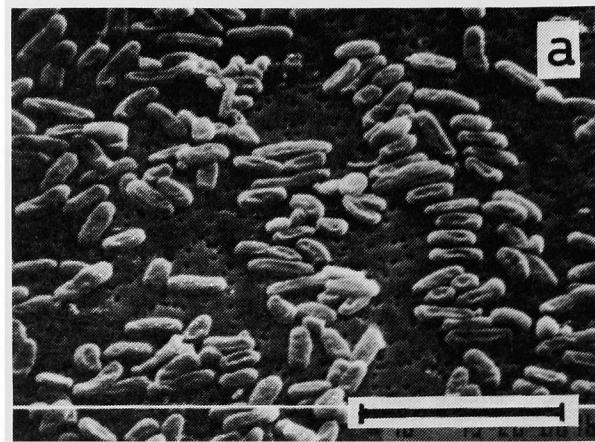


Fig. 5-8. Scanning electron micrographs of F-34 cells under nutrient poor condition (L-medium) and energy free starvation. (a). OG-cells; (b). OG→S(24h) cells; (c). OG→S (3 wk) cells. Bars represent 5 μ m.

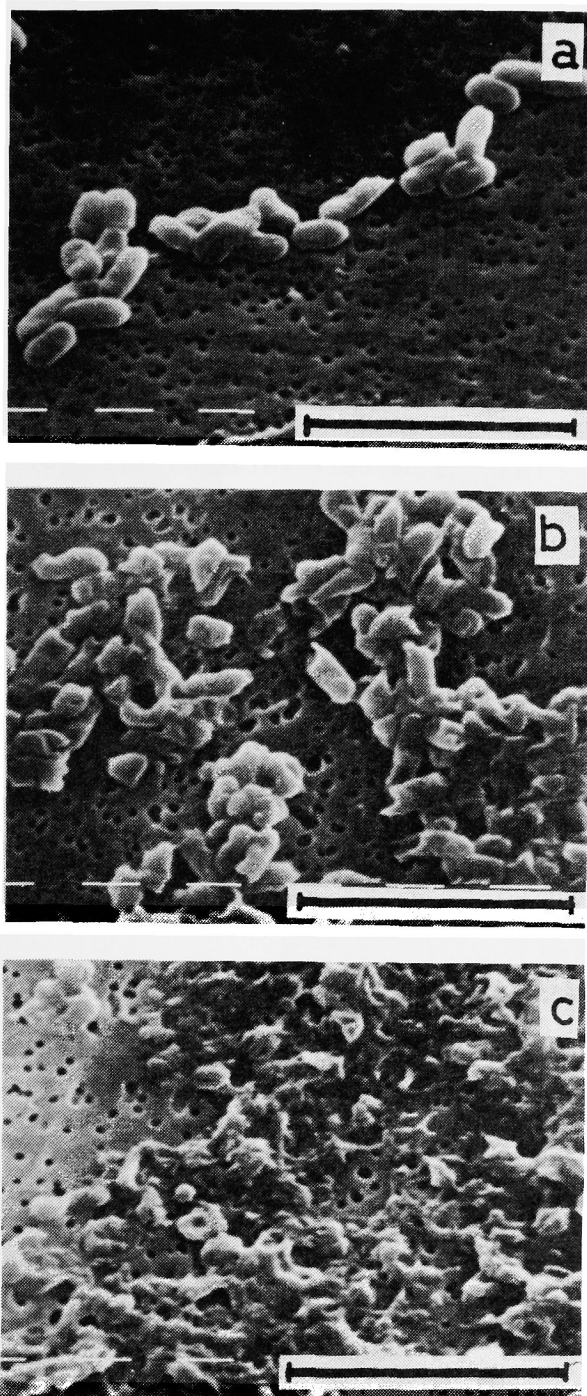


Fig. 5-9. Scanning electron micrographs of UB-33 cells under nutrient rich condition (H-medium) and energy free starvation. (a). EG-cells; (b). EG→S(24h) cells; (c). EG→S (3 wk) cells. Bars represent 5 μ m.

細胞体積

SEM像から、様々な有機物濃度環境における細胞体積を、それぞれ20～50細胞を無作為に選び出して算出し、Table 5-6にまとめた。EG-cellの細胞体積は $0.66 \mu\text{m}^3$ であり、EG→Sで6時間経過後には $0.26 \mu\text{m}^3$ と半分以下の体積になり、24時間後にはさらに半量の $0.12 \mu\text{m}^3$ に減少した。OG-cellの細胞体積は $0.19 \mu\text{m}^3$ であった。OG→Sで6時間経過した細胞の体積は $0.24 \mu\text{m}^3$ であり、24時間後の細胞体積は $0.18 \mu\text{m}^3$ と、細胞体積に変化はなかった。

Table 5-6. Changes on cell volumes (μm^3) of a facultative oligotroph (F-34) under a starvation condition.

	Starvation time (h)		
	0	6	24
EG→S	$0.66 \pm 0.24^*$	0.26 ± 0.06	0.12 ± 0.03
OG→S	0.19 ± 0.06	0.24 ± 0.11	0.18 ± 0.09

* , standard error; EG→S, cells were grown in H medium (ca. $300 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$); OG→S, cells were grown in L medium (ca. $0.3 \text{ mgC} \cdot \text{l}^{-1}$).

透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

通性低栄養細菌F-34株を、EG, EG→S (24h), OG, とOG→S (24h) の4つの異なる環境に置き、それぞれの細胞のTEM像をFig. 5-10に示した。EG-cellでは、細胞内に多くの電子密度の高い顆粒状の物質を認めた。EG-cellと比べ、EG→S (24h) の細胞には顆粒状物質をあまり認めず、ペリプラズム空間が拡大していた (細胞質の消失)。OG-cellはEG→S (24h) の細胞よりも、EG-cellと似た形態を示した。OG→S (24h) の細胞もOG-cellと比べると、ややペリプラズム空間が拡大しているが、EG→S (24h) の細胞ほどの変化はなかった。

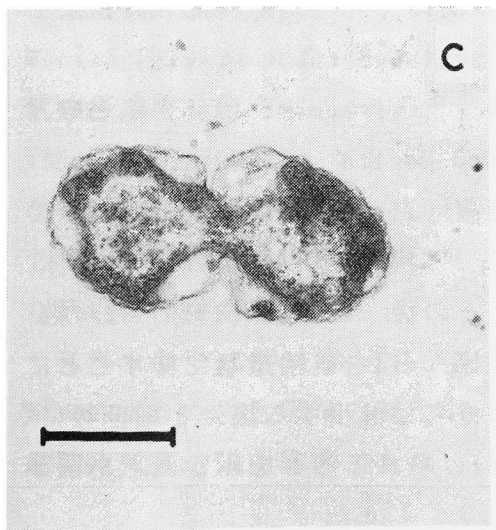
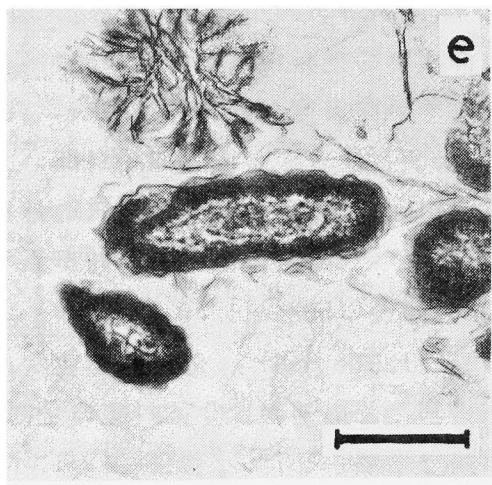
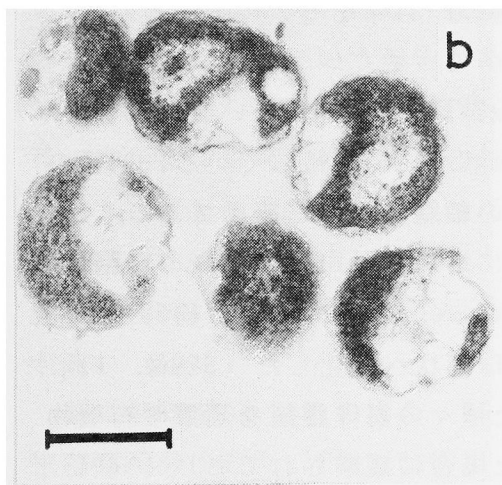
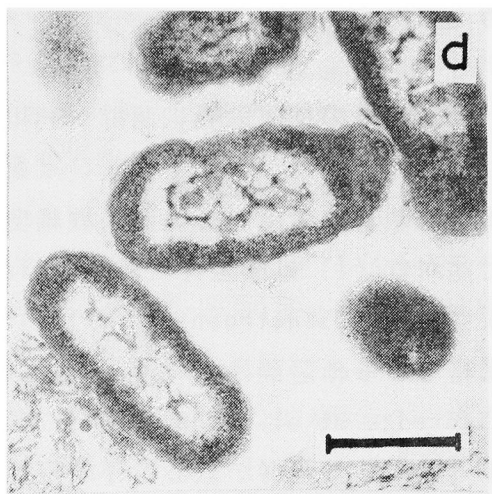
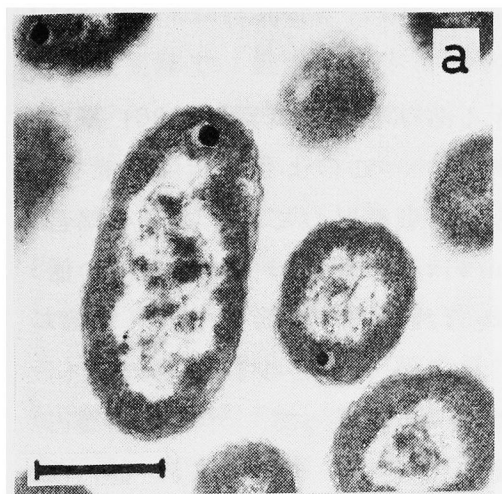


Fig. 5-10. Transmission electron micrographs of F-34 cells. (a), EG-cells; (b) and (c), EG→S(24h) cells; (d), OG-cells; (e), OG→S(24h) cells. Bars represent 0.5 μ m.

考 察

外洋水中の従属栄養細菌群が利用できる溶存態有機炭素 (BDOC) 量は、 $20 \sim 350 \mu\text{gC/l}$ と極めて少ない (第1章参照)。このように利用可能な有機物が希薄な環境での従属栄養細菌群の生存戦略としては、本章の緒言に述べた (1) 飢餓生存 (Starvation-Survival)、(2) 付着、(3) 低栄養増殖 (Oligotrophic Growth) が考えられる。外洋海水中で (2) の戦略をとる細菌群は、通常、全体の $0.1 \sim 4\%$ 程度と少数派である (Allredge et al., 1986; 第3章3節参照)。したがって、外洋域で優占する低栄養細菌群が取る生存戦略は、残された (1) または (3) ということになる。ここでは、通性低栄養細菌のF-34株をモデル細菌として、外洋域での生存状態を考察した。

まず、高濃度有機物環境 (ca. 300 mgC/l) で増殖しているF-34株のEG-cellと低濃度有機物環境 (ca. 0.3 mgC/l) で増殖しているF-34株のOG-cellの飢餓環境 (人工海水のみ) での細胞について比べてみる。EG→Sの場合、24時間後には細菌数が4～5倍に増加し (Fig. 5-1)、細胞体積は6時間後でEG-cell ($0.66 \mu\text{m}^3$) の約40%、24時間後には約20%に減少し (Table 5-6)、形態も桿菌状から球菌状へ変化した (SEM像, Fig. 5-7)。このような変化は、純粋分離した種々の海洋細菌を高濃度有機物環境で増殖させた後、飢餓環境に移した場合に観察されており (Novitsky and Morita, 1976; Kjelleberg et al., 1982; Amy and Morita, 1983)、この現象を“増殖なき分裂 (division without growth) ”、“こびと化 (dwarfing) ”、または“断片化 (fragmentation) ”と呼んでいる。この現象について、Novitsky and Morita (1977) は、ナリジキシン酸を用いた飢餓実験から、海洋細菌 (*Vibrio* sp., Ant-300株) のfragmentationにはDNA合成を必要とせず、EG状態で保有していた染色体を分裂細胞に分配すると推定している。その後、Morita (1985) は、数種の海洋細菌について行った実験から、EG-cellを飢餓環境に移すことによる変化は上記の現象の他に、細胞数が直ちに減少する場合と細菌数に大きな変化のない場合の3つのケースに分けられることを示した。Nys-

tröm and Kjelleberg (1987) は、ある種の海洋細菌 (S14株, 未同定) の飢餓実験で、飢餓培地中にDNA合成を阻害する重金属イオン (Cd^{2+}) やナリジキシ酸を添加すると、“増殖なき分裂” が起こらず、生菌数が減少したことから、fragmentationの過程にはDNA合成が必要であるとしている。ただ、このS14株のEG→SのDNA合成活性は、EG→S (150 min) でEG-cellの約20 %, EG→S (6 h) では約2 %にまで減少し、DNA合成活性は極めて低い (Nyström and Kjelleberg, 1989)。F-34株やF-206株の場合、EG→Sでナリジキシ酸を添加しても、無添加と同様に生菌数が数倍に増加したが (Fig. 5-1c, Fig. 5-2), ^3H -チミジンのDNA画分への取り込みは、完全に阻害されていなかった (EG-cellの5~10 %)。飢餓環境に晒される時間が長いほど、膜構造の変化からある種の抗生物質に対する耐性が強くなるという報告がある (Strenström et al., 1989)。F-34株の場合も、TEM像から、細胞の膜構造の変化に伴う、抗生物質の透過性の変化による可能性が考えられる。F-211株は、EG→Sでナリジキシ酸にさらすと生菌数が減少した (Fig. 5-2)。この場合、 ^3H -チミジンの取り込みは完全に停止していた。この通性低栄養細菌3株について見る限り、EG-cellのfragmentation過程では、DNA合成活性が必要になる可能性が高い。

富栄養細菌UB-33株の場合、EG→Sでfragmentationが起こらず、直ちに生菌数が減少した (Fig. 5-5)。このような現象は、富栄養細菌の代表格である大腸菌でも報告されており (Reeve et al., 1984)、上述したMorita (1985) の2つ目のパターンに当る。この富栄養細菌UB-33株は、飢餓環境で自己溶解 (autolysis) を起こしているようであり (Fig. 5-9)、ストリンジェント・コントロールが不十分なために細胞壁の分解が進行したのかも知れない (Tuomanen and Tomasz, 1986)。いずれにしても、富栄養細菌は低栄養細菌に比べると飢餓環境での生存能力がかなり低いようである。

外洋水中でEG→Sのように、高濃度有機物環境から直ちに飢餓環境へ移動するような生息環境の変化が従属栄養細菌群に起こる可能性は、付着細菌や魚類の腸内細菌でもない限りないであろう (Kjelleberg, et al.

， 1987)． 上述したように付着細菌は全体のごく一部にすぎないから， 外洋域で優占する低栄養細菌群の生存戦略を知るには， EG→SでなくOG→Sのような， 低栄養環境から飢餓環境への移動といった状況を設定する方が現実的である． そこで， 通性低栄養細菌F-34株のOG→Sの場合について検討した． 低栄養から飢餓へ移すと， EG→Sと同様に生菌数が数倍に増加した (Fig. 5-1d)． しかし， F-34株のOG-cellでは， 飢餓環境に移しても細胞体積の減少 (Table 5-6) や形態の変化 (桿菌状→球菌状) が起こらず， Ant-300株 (Novitsky and Morita, 1977)， S14株 (Mårdén et al., 1985)， 及びF-34株のEG-cellが飢餓環境で起こすfragmentation現象を認めなかった． F-34株のOG→Sの細胞のナリジキシン酸に対する反応もEG→Sとは異なった． 飢餓環境中でナリジキシン酸にさらすと， OG→S (24h) の細胞は， EG→S (24h) の細胞と同じようにOG-cellの5 %前後のDNA合成活性を残していたが， 生菌数が増加するEG→Sと異なり， 徐々に生菌数が減少した (Fig. 5-1d)． OG-cellの飢餓環境でのナリジキシン酸に対する反応は， EG→Sの飢餓細胞よりもむしろ， OG-cellやEG-cellのような増殖細胞に近いものと思われる． すなわち， OG→Sの場合， OG-cellは飢餓環境で“増殖なき分裂”をするのではなく， 程度は低いが増殖 (oligotrophic growth) 状態にあると考えるのが妥当ではないだろうか．

本菌のOG-cellが飢餓環境中で増殖していることを明確にするため， 初発菌濃度について検討を加えた． EG→Sの場合， 菌濃度を 10^3 ， 10^5 ， 10^7 cells \cdot ml $^{-1}$ と変えてもfragmentationが起こり細菌数が増加した． OG→Sの場合， 初発菌濃度を 7.0×10^3 cells \cdot ml $^{-1}$ にすると， 24時間後に 3.1×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ ， 72時間後には 6.0×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ に増加した． ところが， 菌濃度を 7.0×10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ と100倍に増して飢餓状態にすると， 生菌数は経時変化しなかった (Fig. 5-3)． このような， EG→SとOG→Sの違いは， DNA合成活性にも認められた． すなわち， EG→Sの場合は菌濃度にかかわらず， 24時間後には元の10 %以下にDNA合成活性が低下した． ところが， OG→Sの場合， 菌濃度が高いと (10^5 cells \cdot ml $^{-1}$)， DNA合成活性は元の20 %程度まで低下したのに対して， 菌濃度を低くする (10^3

cells · ml⁻¹) と, 72時間後でも3時間後と同程度のDNA合成活性を保持していた (Fig. 5-6). EG→S (10³と10⁵ cells · ml⁻¹) と OG→S (10⁵ cells · ml⁻¹) のDNA合成活性の変化パターンは, 他の海洋細菌のEG→SでのDNA合成活性の変化パターン (Mårdén et al., 1988; Nyström and Kjelleberg, 1989) と酷似しており, 海洋細菌が飢餓状態に入る時の典型的な現象と考えられる. しかしながら, 低い菌濃度 (10³ cells · ml⁻¹) でのOG→Sの場合, 72時間後でも細胞体積や形態に大きな変化はなく, 生菌数の増加と共にDNA合成活性も高くなることからみて, OG-cellが飢餓環境で引続き増殖していることは明かである.

無機塩類のみの培地を用いた飢餓実験や低濃度有機物培地による増殖実験を行う時に注意しなければならないのは, 空気中からの微量の揮発性有機物の混入である (Geller, 1983). 本研究で使用したガラス器具は, 十分に洗浄し, 再蒸留水でゆすいだ上, 450℃で1時間以上燃焼した. また, 飢餓実験は, テフロンライナーの付いたスクリュキャップで三角フラスコの口を閉じ, 振とうしないように注意して, 静置培養を行った. したがって, 空気中の有機物が溶け込む可能性は, 一定時間毎にフタを開けて試料の採取を行うときぐらいである. このときに溶け込むとしても, OG-cellが利用するごく一部と考える. Schmid and Alexander (1985) は, 100 μg/l (フェノール) で前培養した *Pseudomonas acidovorans* を, 有機物の混入がないように厳密に調製した無機塩類のみの培地に接種 (10² cells · ml⁻¹) すると, 24~30時間後に生菌数 (CFU/ml) が10⁵ cells · ml⁻¹ に達することを報告している. 彼らは, 無機塩類の培地に10 μg/l~100 mg/lのフェノールを添加し, それぞれの培地での生菌数の増殖を調べることで, いかに厳密な調製法をとっても, 約50 μg C/lの不明DOC (UDOC, Uncharacterized DOC) が無機塩類のみの培地に溶け込んでいると推定している. OG→SでF-34株は, 細菌数が 7.0 × 10³ cells · ml⁻¹ (0h) から, 6.0 × 10⁴ cells · ml⁻¹ (72h) に増加している (Fig. 5-3). 飢餓培地中で増加した細胞数 (ΔN) は, 5.3 × 10⁴ cells · ml⁻¹ である. このときの細菌細胞の体積 (V) を 0.19 μm³ とし (Table 5-6), 細胞体積当りの炭素量 (f) を 5.6 × 10⁻¹³ gC · μm³ (

Bratbak, 1985) とすると, 飢餓環境で F-34 株の OG-cell が体構成成分として取り込んだ Δ DOC 量は, Δ DOC = Δ N \times V \times f から, 5.6 μ gC/l となる. つまり, 通性低栄養細菌 (F-34 株) の OG-cell は, 飢餓培地中の UDOC の 5.6 μ gC/l を利用して, 10^3 cells \cdot ml $^{-1}$ から 10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ 近くまで増殖したことになる. OG \rightarrow S で通性低栄養細菌 (F-34 株) が到達する最大生菌数 (最大コロニー計数值; MCC, Maximum Colony Count) は, 72 時間後の 6.0×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ である. Shibata et al. (1986) が, 半導体洗浄用の超純水中の DOC と MCC との関係調べたグラフから, DOC が 5.6 μ gC/l のときの MCC を見積ると 7.0×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ になり, ここで得た OG \rightarrow S (72h) の生菌数と近似した値になった. 彼らは, 半導体の洗浄用に繰り返し使う超純水中の微量有機物の除去に低栄養細菌を利用しようとしており, 半導体洗浄水中の DOC 量を最終的に 5 μ gC/l 以下まで下げることに成功している. この 5 μ gC/l が利用可能な DOC の閾値 (threshold) とすれば, F-34 株の OG-cell は, 外洋水中に 10 μ gC/l 以上の BDOC があれば, 低栄養増殖できることになる. すなわち, EG-cell は飢餓環境に移ると, BDOC の存在にかかわらず “増殖なき分裂” の状態に入るが, OG-cell は飢餓環境に極微量存在する. EG-cell では利用できない BDOC を効率よく利用して, 10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ 付近まで増殖するのである.

低栄養細菌が有機物濃度の極めて低い環境で生存し続けるためには, それを支えるだけの基質取り込み能力を備えていなければならない. 多くの研究者は, EG \rightarrow S の実験系により, 水生従属栄養細菌が, 環境水中の有機物濃度の変化に応じて基質取り込み系を切り替え, 外洋のような有機物濃度の希薄な環境での生存を可能にすると推定している (Geesey and Morita, 1979; Akagi and Taga, 1980; Mårdén et al., 1987). この取り込み系の切り替えができない海洋細菌は, 飢餓環境での生存能力が低くなるとされている (Davis and Robb, 1985). ただ, これらの報告は, 増殖していないが生体維持のための活性は持つ (non-growing but active, Kjelleberg et al., 1987) という飢餓細胞を想定した実験であり, 低栄養細菌のように増殖状態 (OG) にある場合を考えたものではない. Azam and Cho (1987) は, 外洋海水中での浮遊細菌の増殖を唱

えているが、それを裏付けるための海洋細菌（分離菌株）の基質取り込み実験は、EG→Sの条件で行っており（Nissen et al., 1984）、彼らの研究も、外洋海水中で増殖している細菌の生理状態を十分に反映しているとは言い難い。従って、本研究で明らかにしたように、外洋域で優占するのが低栄養細菌群であることを考慮すると、低栄養環境で増殖している細菌（OG-cell）を用いた実験が必要になる。OG状態の細菌を用いた実験では、Ishida et al. (1982) が、淡水性の通性低栄養細菌（*Aeromonas* sp.）を高濃度有機物培地（2.7 mM, グルタミン酸）で培養した場合（H-cell）と、低濃度有機物培地（0.11 μ M, グルタミン酸）で培養した場合（L-cell）について、グルタミン酸の取り込み活性を調べている。彼らは、L-cellがH-cellに比べ低濃度域でより効率的な取り込み系を持つことを示し、通性低栄養細菌が低栄養な湖沼や海洋で効率よく増殖するとしている。本研究でも、EG→Sの実験により、通性低栄養細菌（F-34株）が、富栄養細菌（UB-33株, *E. coli* K12株）に比べ、低濃度域（nM）で高い取り込み活性を持つことを示したが、同じ通性低栄養細菌でも、OG-cellとEG→S（24h）の細胞を比べると、OG-cellの方が、更に高い基質取り込み能力を持つことを認めた（Table 5-5）。すなわち、飢餓細胞の更に活性化された状態がOG-cellであり、このOG-cellの持つ効率的な基質取り込み系が、外洋域での低栄養細菌群の増殖を支えているのである。

熊野灘の現場外洋水中のグルタミン酸とグリシンのflux rate（細菌細胞当たりの1日の取り込み量）は、それぞれ $2.2 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ （ $=9.1 \times 10^{-9} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ ）と、 $2.0 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ （ $=8.3 \times 10^{-9} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ ）であった（第4章参照）。室内の培養実験では、通性低栄養細菌（F-34株）の25 nMでのグルタミン酸とグリシンの初期取り込み速度は、OG-cellの場合、それぞれ $5.4 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ と $2.5 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり、飢餓細胞（EG→S, 24 h）の場合、それぞれ $2.5 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ と $0.4 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。グルタミン酸は、OG-cellも飢餓細胞も共に現場のflux rateと近似した値になったが、グリシンの場合は、OG-

cellの方が飢餓細胞よりも現場のflux rateと近似した値を示した。このことから、外洋域の従属栄養細菌群の状態を考える場合、“Starvation-Survival”よりも“Oligotrophic Growth”の概念の方が、より現場を反映すると思われる。

F-34株のTEM像にも、EG、EG→S、OG、とOG→S、のそれぞれの特徴が表れている（Fig. 5-10）。EG-cellには、多数の電子密度の高い顆粒状物質を認めた（Fig. 5-10a）。Wiebe and Chapman（1968）も、海洋から分離した*Achromobacter* sp.を高濃度培地で培養した細胞のTEM像で、F-34株のEG-cellとよく似た顆粒状物質を観察している。Mårdén et al.（1985）は、海洋細菌（S14株、未同定）のEG-cellのTEM像に認めた顆粒状物質が、炭素源の貯蔵物質のPHB（poly- β -hydroxybutyrate）であると示し、このEG-cellを27時間飢餓環境におくと、PHBが消失すると報告している。F-34株の場合も、EG→Sで24時間経過後の細胞には顆粒状の物質があまり認められなくなった（Fig. 5-10b,c）ことから、これが栄養物の貯蔵物質である可能性は高い。EG→S（24h）の細胞は、細胞質をかなり消失しており、EG-cellとは全く異なる様相を呈した。このF-34株のEG→S（24h）でのTEM像は、*Cytophaga johnsonae*の飢餓状態の球菌状細胞とよく似ていた（Reichardt and Morita, 1982）。“増殖なき分裂”をした飢餓細胞のペリプラズム空間が拡大するという報告がある（Novitsky and Morita, 1976; Mårdén et al., 1985）。F-34株の場合も、EG→S（24h）でペリプラズム空間の拡大が認められた。OG-cellでは、EG-cellで観察した顆粒状物質はあまり認められず、飢餓細胞（EG→S）に認められたペリプラズム空間の拡大もなかった（Fig. 5-10d）。OG→S（24h）のTEM像は、初発菌濃度を 10^7 cells \cdot ml $^{-1}$ の高密度で飢餓実験を行った細胞系で撮影したので、残念ながらUDOCを利用して増えたOG-cellの状態ではない。OG-cellと比べるとペリプラズム空間の拡大が少し認められたが、EG→S（24h）ほど劇的な変化ではなかった（Fig. 5-10e）。

第3節 摘 要

(1) 希釈法により純粋分離した偏性低栄養細菌9株は、すべてグリシンを利用したが、酢酸を利用したのは4株であった。希釈法による偏性低栄養細菌の分離操作の途中で高栄養培地でも増殖が可能になった適応性通性低栄養細菌や通性低栄養細菌は、すべてグリシンと酢酸を共に利用した。

(2) 通性低栄養細菌は、*Vibrio-Aeromonas*群を中心に、比較的多様な細菌相を示したが、適応性通性低栄養細菌は、*Pseudomonas-Alteromonas*群がその70 %以上を占めた。

(3) 通性低栄養細菌 (F-34株) を高栄養培地で培養し (EG-cell), 飢餓環境に移した場合 (EG→S), 24時間後には、細菌数が4~5倍に増加すると同時に、細胞体積は元の約20 %まで減少し、形態も桿菌状から球菌状へと変化した (fragmentation現象)。このとき、DNA合成活性も、EG→S (24h) で元の10 %以下まで低下した。

(4) 同じ通性低栄養細菌を低栄養培地で培養し (OG-cell), 飢餓環境に移した場合 (OG→S), 生菌数の増加とともにDNA合成活性も上昇し、細胞体積や形態の変化もなく、fragmentation現象を起こさなかった。これは、OG-cellが、EG-cellでは利用できない、飢餓環境に極微量混入するDOC (UDOC) を利用して、増殖を続けていることによると推定した。

(5) 富栄養細菌を飢餓環境に移した場合、fragmentation現象を起こさなかったが、かといって増殖もできず、徐々に生菌数が減少した。

(6) 低濃度域 (25 nM) での有機基質の取り込み活性は、富栄養細菌よりも通性低栄養細菌の方が高かったが、同じ通性低栄養細菌でも飢餓細胞 (EG→S) とOG-cellでは、OG-cellの方がさらに高い活性を示した。

(7) 現場外洋海水中 (熊野灘) のグルタミン酸とグリシンのflux rate (細菌細胞当りの1日の基質取り込み量) は、それぞれ 2.2×10^{-4} と 2.0×10^{-4} $\text{pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。通性低栄養細菌 (F-34株) のグルタミン酸とグリシンの取り込み活性は、飢餓細胞の場合、 2.5×10^{-4} と 0.4×10^{-4} $\text{pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であったが、OG-cellの場合、 5.4×10^{-4} と

$2.5 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり, 0G-cellの方がより現場の flux rateと近似した値を示した.

第6章 総括

本研究では、外洋域の従属栄養細菌群を外洋海水と同程度の低栄養液体培地を用いた新しい手法で捉え、これを低栄養細菌群とし、本細菌群の生態・生理を解明することを試みた。

得られた結果をまとめると以下のとおりである：

(1) ^{14}C -MPN法（またはDC-MPN法）により、熊野灘海域、西太平洋、南シナ海、南極海等で細菌の計数実験を行った結果、外洋域では内湾域と異なり、従属栄養細菌群のほとんどすべてが低栄養細菌、特に偏性低栄養細菌であることを明らかにした。ただ、外洋域の細菌群のわずか0.1～1%を占める付着細菌群（ $>5\mu\text{m}$ ）では、富栄養細菌または通性低栄養細菌が優勢であった。

^{14}C -MPN法では、細菌の増殖を ^{14}C -有機物の取り込みにより確認するが、低栄養培地に極微量添加する ^{14}C -有機物の種類を変えることで細菌群の持つ基質利用性を知ることができる。外洋域で優占する低栄養細菌は、アミノ酸、特にグリシンをよく利用するが、酢酸の利用性は低いなど基質特異性の高いことが明らかになった。

南極海の実験結果から、偏性低栄養細菌の優占する全海水の細菌群と異なり、富栄養細菌や通性低栄養細菌の優占する付着細菌群は、基質特異性の低いことを確認した。

(2) 現場海水中の基質取り込み活性を測定した結果、内湾域に比べ外洋域では、最大基質取り込み速度（ V_{max} ）が低く、代謝回転時間（ T_t ）が長くなる傾向を認めた。しかし、 ^{14}C -MPN法を用いて V_{max} 値を細菌細胞当りに換算する（ $V_{\text{max}}/\text{cell}$ ）と、外洋域の低栄養細菌の基質取り込み活性は、内湾域の細菌群と同程度、もしくはそれ以上であることが明らかになった。

いずれの海域においても、グルタミン酸とグリシンを用いた場合は、Michaelis-Mentenの基質飽和曲線によく合致し、従属栄養細菌群の代謝活性が高かった。しかし、内湾域と異なり、外洋域ではグルコース、グリコール酸、そして酢酸に対する活性が低くなる傾向を認めた。最も特

徴的なのは、外洋域の試料の半数以上が酢酸に対する取り込み活性をまったく示さなかったことである。これは、 ^{14}C -MPN法により明らかにした外洋域の低栄養細菌が持つ高い基質特異性と一致し、低栄養細菌の存在の重要性を示す。

(3) 希釈法により偏性低栄養細菌の純粋分離を試みた。偏性低栄養細菌29株中20株の細菌が分離操作の過程で適応により、高栄養培地にも増殖可能な通性低栄養細菌（適応性通性低栄養細菌）となった。適応しなかった偏性低栄養細菌9株と適応性通性低栄養細菌17株。さらに寒天平板法で分離した通性低栄養細菌17株の酢酸とグリシンの利用性を調べた。偏性低栄養細菌9株はすべてグリシンを利用したが、酢酸を利用する菌株は9株中4株であった。適応性通性低栄養細菌17株と通性低栄養細菌17株は、すべて酢酸とグリシンを共に利用した。常法に従い、適応性通性低栄養細菌17株と通性低栄養細菌17株の分類を行った。通性低栄養細菌は、*Vibrio*-*Aeromonas*群のほか、*Flabobacterium*属、*Pseudomonas*-*Alteromonas*群、*Alcaligenes*属など細菌相が多様であったのに対し、適応性通性低栄養細菌は70 %以上が*Pseudomonas*-*Alteromonas*群に占められていた。

通性低栄養細菌（F-34株）を高栄養培地で増殖させた（EG-cell）後、飢餓環境へ移した場合（EG→S）。また低栄養培地で増殖させた（OG-cell）後、飢餓環境へ移した場合（OG→S）。について増殖の特性や基質取り込み活性を調べた。EG→Sでは、24時間後には細菌数が4～5倍に増加し、細胞体積は元の約20 %まで減少し、形態も桿菌状から球菌状へと変化した（fragmentation現象）。このとき、DNA合成活性も、EG→Sで24時間後には元の10 %以下まで低下した。ところが、OG→Sの場合、細菌数の増加と共にDNA合成活性も上がり、細胞体積や形態の変化もなかった。これは、EG-cellでは利用できない飢餓環境に極微量混入したDOCを利用してOG-cellが飢餓環境でも引続き増殖することによると推定した。富栄養細菌を飢餓環境に移した場合は、fragmentation現象を起こさず、徐々に生菌数が減少した。外洋海水中的細菌群の生存状態を模式的にまとめるとFig. 6-1のようになる。

低濃度域（25nM）での基質取り込み活性は、富栄養細菌よりも通性低

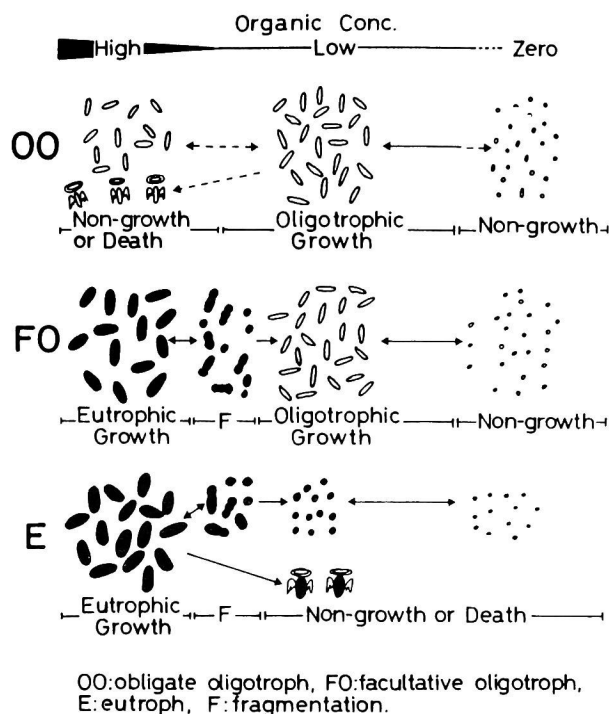


Fig. 6-1. Schematic model of morphological changes in living forms of obligate oligotrophs, facultative oligotrophs and eutrophs under various nutritional conditions.

栄養細菌の方が高かったが、同じ通性低栄養細菌でも、EG→Sの飢餓細胞とOG-cellでは、OG-cellの方がさらに高い活性を示した。

現場外洋海水中（熊野灘）のグルタミン酸とグリシンのflux rate（細菌細胞当りの1日の基質取り込み活性）は、それぞれ 2.2×10^{-4} と $2.0 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。通性低栄養細菌（F-34株）のグルタミン酸とグリシンの取り込み活性は、飢餓細胞の場合、 2.5×10^{-4} と $0.4 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であったが、OG-cellの場合、 5.4×10^{-4} と $2.5 \times 10^{-4} \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり、OG-cellの方がより現場のflux rateと近似した値を示した。

以上のことから、外洋海水中の低栄養細菌の生存状態を考える場合、“starvation-survival”よりも、“oligotrophic-growth”の概念の方がより現場での状態を反映すると推論した。

Summary and conclusions

Heterotrophic bacteria in pelagic seawaters were studied by a new counting method using oligotrophic liquid medium which has similar organic nutrient concentrations to oceanic seawater. These detected bacteria are called oligotrophic bacteria. This study is attempted to elucidate ecological and physiological significance of the oligotrophic bacteria in the pelagic ocean.

The results obtained are summarized below:

(1) From the results of bacterial counts by ^{14}C -MPN method (or DC-MPN method) in pelagic seawaters, such as the Kumano-nada Sea, the West Pacific Ocean, the South China Sea, and the Antarctic Ocean, almost all the heterotrophic bacteria in the oceanic waters were occupied by oligotrophic bacteria, especially obligate oligotrophs. This tendency was different from coastal waters. However, attached bacteria ($>5\text{ }\mu\text{m}$) which was only 0.1-1 % of the total heterotrophs in oceanic waters, were predominated by eutrophs and facultative oligotrophs.

In ^{14}C -MPN method, bacterial growth were detected by the uptake of ^{14}C -organic compounds. By adding different kinds of ^{14}C -substrates in poor media,

substrate utilization of bacteria was investigated. Oligotrophic bacteria in pelagic seawaters were found to have high substrate specificities and utilize amino acids, especially glycine well, but acetic acid poorly.

From the results in the Antarctic Ocean, attached bacteria which were predominated by eutrophs and facultative oligotrophs were found to have low substrate specificities.

(2) Comparing to the coastal seawaters, the uptake potential (V_{max}) and turnover time (T_t) in pelagic seawaters tended to become lower and longer respectively. However, by calculating the V_{max} specific activity (V_{max}/cell) from heterotrophic bacteria enumerated by ^{14}C -MPN method, the uptake rate of oligotrophic bacteria in pelagic seawaters was similar or even greater than that of bacteria in coastal waters.

When using glutamate and glycine as a substrate, heterotrophic bacteria showed high metabolic activity and their activity followed the Michaelis-Menten equation in either waters. However, different from heterotrophs in the coastal waters, heterotrophs in the pelagic waters tended to have low activity toward

glucose, glycolate, and acetate. Uptake activity of acetate was the most distinctive in the ocean. More than half of the samples of the pelagic seawaters had no uptake activity toward acetate. This result is in good agreement with the high substrate specificities of oligotrophic bacteria in pelagic seawaters from ^{14}C -MPN method, and suggests the importance of the existence of oligotrophic bacteria.

(3) Obligate oligotrophs were isolated by dilution method. Adaptation under the isolation procedure made 20 out of 29 strains of obligate oligotrophs into facultative oligotrophs (adapted facultative oligotroph) which are able to grow in rich media. All 9 strains of obligate oligotrophs utilized glycine, but only 4 out of the 9 strains utilized acetate. All tested adapted facultative oligotrophs (17 strains) and facultative oligotrophs (17 strains) utilized both acetate and glycine. Seventeen strains each of the adapted facultative oligotroph and the facultative oligotroph were identified according to standard methods. The bacterial flora of facultative oligotrophs were composed of various groups of bacteria such as Vibrio-Aeromonas group, Flavobacterium sp., Pseudomonas-Alteromonas group, and

Alcaligenes group, while more than 70 % of adapted facultative oligotrophs were Pseudomonas-Alteromonas group.

Growth patterns, morphology, bio-volume and uptake rate of an isolated facultative oligotroph (F-34) were investigated under various nutritional conditions. After 24h-starvation of EG-cells (grown in rich medium)[EG→S(24h)], the number of viable cells increased 4-5 folds, the cell volume decreased to about 20 %, and the shape changed from short-rod to coccid (fragmentation process). DNA synthesis also decreased to 10 % after 24h-starvation. On the other hand, DNA synthesis increased along with the increase in the number of bacteria and no change in cell volume and shape were observed in 24h-starvation of OG-cells (grown in poor medium). This may be explained by the growth of OG-cells during starvation by utilizing the small amount of DOC in the starvation menstuum which EG-cells could not utilize. In the case of a starvation of an eutroph (UB-33), cell fragmentation did not occur, and the number of viable cells decreased gradually. At a low concentration range (25 nM), facultative oligotrophs had higher uptake activity than eutrophs.

And in facultative oligotrophs, OG-cells had higher uptake activity than starved cells [EG → S (24h)].

The in situ flux rate of glutamate and glycine in pelagic seawaters was 2.2×10^{-4} and 2.0×10^{-4} pmol · d⁻¹ · cell⁻¹, respectively. Though glutamate and glycine uptake rates of a facultative oligotroph (F-34) under the EG→S(24h) condition were 2.5×10^{-4} and 0.4×10^{-4} pmol · d⁻¹ · cell⁻¹, respectively, uptake rates of Glu and Gly of OG-cells were 5.4×10^{-4} and 2.5×10^{-4} pmol · d⁻¹ · cell⁻¹. This indicates that the uptake rate of OG-cell had the better approximation to the flux rate of the pelagic seawater.

From the results above, it is assumed that "oligotrophic growth" is better than "starvation survival" in expressing the living forms of oligotrophic bacteria under oceanic condition.

謝 辞

本研究に当たり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭達を賜った、京都大学農学部教授 石田祐三郎先生に心からお礼を申し上げます。

また、本研究の機会を与えられ、研究遂行にご理解とご鞭撻を賜った、近畿大学農学部教授 河合 章先生、ならびに京都大学名誉教授 門田元先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、多くの御助言と御協力をいただいた、三重大学名誉教授 林 孝市郎先生、三重大学教授 菅原 庸先生、京都工芸繊維大学教授 原 三郎先生、京都大学助教授 内田有恒先生、京都大学助手 左子芳彦博士、高知大学助教授 深見公雄博士、京都大学農学部水産微生物学研究室の諸先輩および神戸正彦氏、浅井正秀氏、吉永郁生氏、近畿大学講師 来田秀雄先生、ならびに近畿大学農学部水族環境学研究室の卒業生諸氏に深く感謝致します。

最後に、野外調査の際、御協力を賜った練習船勢水丸（三重大学所属）、研究船白鳳丸（東京大学海洋研究所所属）の船長、士官、船員の皆様に心からお礼申し上げます。

文 献

- Ackley, S. F., Buck, K. R. and Taguchi, S. (1979). Standing crop of algal in the sea ice of the Weddell Sea region. *Deep-Sea Res.* 26: 269-281.
- Akagi, Y., Taga, N. and Simidu, U. (1977). Isolation and distribution of oligotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 23: 981-987.
- Akagi, Y. and Taga, N. (1980a). Uptake of D-glucose and L-proline by oligotrophic and heterotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 26: 454-459.
- Akagi, Y., Simidu, U. and Taga, N. (1980b). Growth responses of oligotrophic and heterotrophic marine bacteria in various substrate concentrations, and taxonomic studies on them. *Can. J. Microbiol.* 26: 800-806.
- Allredge, A. L., Cole, J. J. and Carron, D. A. (1986). Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol. Oceanogr.* 31: 68-78.
- Amy, P. S. and Morita, R. Y. (1983). Protein patterns of growing and starved cells of a marine *Vibrio* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1748-1752.
- Andrews, P. and Williams, P. J. LeB. (1971). Heterotrophic utilization of dissolved organic compounds in the sea. III. Measurement of the oxidation rates and amino acids in sea water. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 51: 111-125.
- Azam, F. and Cho, B. (1987). Bacterial utilization of organic matter in the sea. In *Ecology of Microbial Communities* (Eds. M. Fletcher, T. R. G. Gray and J. G. Jones), pp. 261-281. Cambridge University Press, N. Y.
- Barvenik, F. W. and Malloy, S. C. (1979). Kinetic patterns of microbial amino acid uptake and mineralization in marine waters. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 8: 241-250.
- Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass

- estimations. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1488-1493.
- Brock, T. D. (1987). The study of microorganisms in situ: progress and problems. In Ecology of Microbial Communities (Ed. M. Fletcher, T. R. G. Gray and J. G. Jones), pp. 1-17. Cambridge University Press.
- Carlucci, A. F. and Shimp, S. L. (1974). Isolation and growth of a marine bacterium in low concentrations of substrate. In Effect of the Ocean on Microbial Activities (Ed. R. R. Colwell and R. Y. Morita), pp. 363-367. University Park Press, Baltimore.
- Carlucci, A. F., Shimp, S. L. and Craven, D. B. (1986). Growth characteristics of low-nutrient bacteria from the north-east and central Pacific Ocean. FEMS Microbiol. Ecol. 38: 1-10.
- Collwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A. and Palmer, L. M. (1985). Viable but non-culturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. Biotechnology 3: 817-820.
- Crawford, C. C., Hobbie, J. E. and Webb, K. L. (1974). The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. Ecology 55: 551-563.
- Davis, C. L. and Robb, F. T. (1985). Maintenance of different mannitol uptake systems during starvation in oxidative and fermentative marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 50: 743-748.
- Dawson, M. P., Humphrey, B. A. and Marshall, K. C. (1981). Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. Curr. Microbiol. 6: 195-199.
- Delille, D. and Bouvy, M. (1989). Bacterial responses to natural organic inputs in a marine subAntarctic area. Hydrobiologia 182: 225-238.
- Eguchi, M. and Ishida, Y. (1990). Oligotrophic properties of heterotrophic bacteria and in situ heterotrophic activity in pelagic seawaters. FEMS Microbiol. Ecol. 73: 23-30.

- El-Sayed, S. Z. and Taguchi, S. (1981). Primary production and standing crop of phytoplankton along the ice-algae in the Weddell Sea. *Deep-Sea Res.* 28: 1017-1032.
- Ferguson, R. L. and Sunda, W. G. (1984). Utilization of amino acids by planktonic marine bacteria: Importance of clean technique and low substrate additions. *Limnol. Oceanogr.* 29: 258-274.
- Fonden, R. (1968). A yeast-extract pepton agar for the determination of heterotrophic bacteria in lakes. *Vatten.* 2: 161-166.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- Geesy, G. G. and Morita, R. Y. (1979). Capture of arginine at low concentrations by a marine psychrophilic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1092-1097.
- Geller, A. (1983). Growth of bacteria in inorganic medium at different levels of airborne organic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1258-1262.
- Gillespie, P. A., Morita, R. Y. and Jones, L. P. (1976). The heterotrophic activity for amino acids, glucose and acetate in Antarctic waters. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.* 32: 74-82.
- Gocke, K. (1977). Comparison of methods for determining the turnover times of dissolved organic compounds. *Mar. Biol.* 42: 131-141.
- Gocke, K., Dawson, R. and Liebezeit, G. (1981). Availability of dissolved free glucose to heterotrophic microorganisms. *Mar. Biol.* 62: 209-216.
- Gordon, A. S. and Millero, F. J. (1985). Adsorption mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds. *Microb. Ecol.* 11: 289-298.
- Grimes, D. J., Atwell, R. W., Brayton, P., Palmer, L. M., Rollins, D. M., Roszak, D. B., Singleton, F. L., Tamplin, M. L. and Colwell, R. R. (1986). The fate of

- enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environment. Microbiol. Sci. 3: 324-329.
- Hamilton, R. D. and Preslan, J. E. (1970). Observations on heterotrophic activity in the eastern tropical Pacific. Limnol. Oceanogr. 15: 395-401.
- Hanson, R. B., Shafer, D., Ryan, T., Pope, D. H. and Lowery, H. K. (1983). Bacterioplankton in Antarctic Ocean waters during late austral winter: abundance, frequency of dividing cells, and estimates of production. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1622-1632.
- Hanson, R. B. and Lowery, H. K. (1985). Spatial distribution, structure, biomass, and physiology of microbial assemblages across the southern ocean frontal zones during the late Austral winter. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1029-1039.
- Hirsh, P. (1979). Life under conditions of low nutrient concentrations. In Strategies of Microbial Life Sciences Research Report 13 (Ed. M. Shilo), pp. 357-372. Verlag Chemie, Weinheim.
- Hobbie, J. E. and Wright, R. T. (1965). Competition between planktonic bacteria and algae for organic solutes. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 18: 175-185.
- Höfle, M. G. (1983). Long-term changes in chemostat cultures of Cytophaga johnsonae. Appl. Environ. Ecol. 46: 1045-1053.
- Horowitz, A., Krichevsky, M. I. and Atlas, R. M. (1983). Characteristics and diversity of subarctic marine oligotrophic, stenoheterotrophic and euryheterotrophic bacterial populations. Can. J. Microbiol. 29: 527-535.
- Humphrey, B., Kjelleberg, S. and Marshall, K. C. (1983). Responses of marine bacteria under starvation conditions at a solid-water interface. Appl. Environ. Microbiol. 45: 43-47.
- Ishida, Y., Uchida, A. and Kadota H. (1977). Ecological studies on bacteria in the sea and lake waters polluted with organic substances-IV. Determination of bacterial degradable organic matter in aquatic environments. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.

43: 885-892.

Ishida, Y. and Kadota, H. (1979). A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. Arch. Hydrobiol. Beih. 12: 77-85.

Ishida, Y., Shibahara, K., Uchida, H. and Kadota, H. (1980). Distribution of obligately oligotrophic bacteria in Lake Biwa. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46: 1151-1158.

Ishida, Y. and Kadota, H. (1981). Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. Microb. Ecol. 7: 123-130.

Ishida, Y., Imai, I., Miyagaki, T. and Kadota, H. (1982). Growth and uptake kinetics of a facultatively oligotrophic bacterium at low nutrient concentrations. Microb. Ecol. 8: 23-32.

Ishida, Y., Eguchi, M. and Kadota, H. (1986). Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. 30: 197-203.

Jones, K. L. and Rhodes-Roberts, M. E. (1981). The survival of marine bacteria under starvation conditions. J. Appl. Bacteriol. 50: 247-258.

Jones, R. D. and Morita, R. Y. (1985). Low-temperature growth and whole-cell kinetics of a marine ammonium oxidizer. Mar. Ecol. Prog. Ser. 21: 239-243.

Kimata, M., Kawai, A. and Ishida, Y. (1960). The method for sampling of marine bottom muds. Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.) 26: 1227-1230.

Kjelleberg, S., Humphrey, B. A. and Marshall, K. C. (1982). Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1166-1172.

Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdén, P. and Jones, G. W. (1987). The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. Ann. Rev. Microbiol. 41: 25-49.

- Knauer, G. A., Hebel, D. and Cipriano, F. (1982). Marine snow: major site of primary production in coastal waters. *Nature* 300: 630-631.
- Kottmeier, S. T. and Sullivan, C. W. (1988). Sea ice microbial communities (SIMCO). 9. Effects of temperature and salinity on rates of metabolism and growth of autotrophs and heterotrophs. *Polar Biol.* 8: 293-304.
- Kurath, G. and Morita, R. Y. (1983). Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1206-1211.
- Lee, C. and Bada, J. L. (1975). Amino acids in equatorial Pacific Ocean water. *Earth Planet Sci. Lett.* 26: 61-68.
- Lee, C. and Bada, J. L. (1977). Dissolved amino acids in the equatorial Pacific, the Sargasso Sea and Biscayne Bay. *Limnol. Oceanogr.* 22: 502-510.
- Mallory, L. M., Austin, B. and Colwell, R. R. (1977). Numerical taxonomy and ecology of oligotrophic bacteria isolated from the estuarine environment. *Can. J. Microbiol.* 23: 733-750.
- Mårdén, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G. and Kjelleberg, S. (1985). Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch. Microbiol.* 142: 326-332.
- Mårdén, P., Nyström, T. and Kjelleberg, S. (1987). Uptake of leucine by a marine Gram-negative heterotrophic bacterium during exposure to starvation conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 233-241.
- Mårdén, P., Hermansson, M. and Kjelleberg, S. (1988). Incorporation of tritiated thymidine by marine bacterial isolates when undergoing survival response. *Arch. Microbiol.* 149: 427-432.
- Menzel, D. W. and Ryther, J. H. (1970). Distribution and cycling of organic matter in the oceans. In *Organic Matter in Natural Waters* (Ed. D. W. Hood),

- pp. 31-54. Institute of Marine Science Occasional Publication No. 1. University of Alaska, College.
- Mopper, K. and Lindroth, P. (1982). Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.* 27: 336-347.
- Morita, R. Y. (1977). Heterotrophic activity of microorganisms in Antarctic waters. In *Adaptations within Antarctic ecosystems* (Ed. G. A. Llano), pp. 99-113. Gulf Publishing Co., Houston, Texas.
- Morita, R. Y. (1982). Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. *Adv. Microb. Ecol.* 6: 171-198.
- Morita, R. Y. (1985). Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state. In *Bacteria in Their Natural Environments* (Eds. M. Fletcher and G. D. Floodgate), pp. 111-130. Academic Press.
- Morita, R. Y. (1986). Starvation-survival: the normal mode of most bacteria in the ocean. *Proc. IV ISME* 242-248.
- Nissen, H., Nissen, P. and Azam, F. (1984). Multiphasic uptake of D-glucose by an oligotrophic marine bacterium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 155-160.
- Novitsky, J. A. and Morita, R. Y. (1976). Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 617-622.
- Novitsky, J. A. and Morita, R. Y. (1977). Survival of a psychrophilic marine vibrio under long-term nutrient starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 635-641.
- Novitsky, J. A. and Morita, R. Y. (1978). Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.* 48: 289-295.
- Nyström, T., Marden, P. and Kjelleberg, S. (1986). Relative changes in incorporation rates of leucine and methionine during starvation survival of two bacteria isolated from marine waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:

285-292.

Nyström, T. and Kjelleberg, S. (1987). The effect of cadmium on starved heterotrophic bacteria isolated from marine waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 143-151.

Nyström, T. and Kjelleberg, S. (1989). Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine Vibrio during the initial phase of starvation. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1599-1606.

Oppenheimer, C. H. and ZoBell, C. E. (1952). The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.* 11: 10-18.

Parsons, T. R. and Strickland, J. D. H. (1962). On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in seawater. *Deep-Sea Res.* 8: 211-222.

Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.

Prezelin, B. B. and Alldredge, A. L. (1983). Primary production of marine snow during and after an upwelling event. *Limnol. Oceanogr.* 28: 1156-1167.

Reichardt, W. and Morita, R. Y. (1982). Survival stages of a psychrotrophic Cytophaga johnsonae strain. *Can. J. Microbiol.* 28: 841-850.

Reeve, C. A., Amy, P. S. and Matin, A. (1984). Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 160: 1041-1046.

Schmidt, S. K. and Alexander, M. (1985). Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 822-827.

Servais, P., Billen, G. and M. C. Hascoët (1987). Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Wat. Res.* 21: 445-450.

- Servais, P., Anzil, A. and Ventresque, C. (1989). Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2732-2734.
- Shah, N. M. and Wright, R. T. (1974). The occurrence of glycolic acid in coastal sea water. Mar. Biol. 24: 121-124.
- Shanks, A. L. and Trent, J. D. (1979). Marine snow: Microscale nutrient patches. Limnol. Oceanogr. 24: 850-854.
- Shiaris, M. P., Rex, A. C., Pettibone, G. W., Keay, K., McManus, P., Rex, M. A., Ebersole, J., and Gallagher, E. (1987). Distribution of indicator bacteria and Vibrio parahaemolyticus in sewage-polluted intertidal sediments. Appl. Environ. Microbiol. 1756-1761.
- Shibata, M., Nakamura, K. and Miyaji, Y. (1987). Biological decomposition of trace organic compounds. Wat. Sci. Tech. 19: 417-427.
- Sieburth, J. McN. (1967). J. exp. mar. Biol. Ecol. 1: 98-121.
- Simidu, U., Taga, N., Colwell, R. R. and Schwarz, J. R. (1980). Heterotrophic bacterial flora of the seawater from the Nansei Shoto (Ryukyu Retto) area. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46: 505-510.
- Simidu, U. (1985). Identification of marine bacteria. In Kaiyo Biseibutsu Kenkyuho (Methods in Marine Microbiology) (Eds. H. Kadota and N. Taga), pp. 228-233. Gakkai Syuppan Center, Tokyo.
- Simidu, U., Kogure, K., Fukami, K. and Imada, C. (1986). Heterotrophic bacterial flora of the Antarctic Ocean. Mem. Natl. Inst. Polar Res., Spec. Issue 40: 405-412.
- Simon, M. (1985). Specific uptake rates of amino acids by attached and free-living bacteria in a mesotrophic lake. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1254-1259.
- Stenstrom, T. A., Conway, P. and Kjelleberg, S. (1989). Inhibition by antibiotics of the bacterial

- response to long-term starvation of Salmonella typhimurium and the colon microbiota of mice. J. Appl. Bacteriol. 67: 53-59.
- Stevenson, L. H. (1978). A case for bacterial dormancy in aquatic systems. Microb. Ecol. 4: 127-133.
- Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Board Can. 167: 310p.
- Tabor, P. S. and Neihof, R. A. (1982). Improved micro-autoradiographic method to determine individual microorganisms active in substrate uptake in natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 44: 945-953.
- Tsuda, R., Kumai, H. and Nakamura, M. (1988). Rapid water temperature descent observed during the season of overall warming trends at Uragami Bay. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. (Nippon Suisan Gakkaishi) 54: 419-428.
- Tuomanen, E. and Tomasz, A. (1986). Induction of autolysis in nongrowing Escherichia coli. J. Bacteriol. 167: 1077-1080.
- Vaccaro, R. F. and Jannasch, H. W. (1967). Variations in uptake kinetics for glucose by natural populations in seawater. Limnol. Oceanogr. 12: 540-542.
- Van Es, F. B. and Meyer-Reil, L. A. (1982). Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. Adv. Microb. Ecol. 6: 111-170.
- Wngersky, P. J. (1977). The role of particulate matter in the productivity of surface waters. Helgolander wiss. Meeresunters. 30: 546-564.
- Wiebe, W. J. and Chapman, G. B. (1968). Fine structure of selected marine pseudomonads and achromobacters. J. Bacteriol. 95: 1862-1873.
- Wiebe, W. J. and Hendricks, C. W. (1974). Distribution of heterotrophic bacteria in a transect of the Antarctic Ocean. In Effect of the Ocean environment on Microbial Activities (Eds. R. R. Colwell and R. Y. Morita), pp. 524-535. University Park Press, Baltimore.

- Williams, P. J. LeB. (1973). The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations. *Limnol.Oceanogr.* 18: 159-164.
- Wright, R. T. and Hobbie, J. E. (1966). Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* 47: 447-464.
- Wright, R. T. and Shah, N. M. (1975). The trophic role of glycolic acid in coastal seawater. I.Heterotrophic metabolism in seawater and bacterial cultures. *Mar. Biol.* 33: 175-183.
- Wright, R. T. (1978). Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 297-305.
- Yanagita, T., Ichikawa, T., Tsuji, T., Kamata, Y, Ito, K. and Sasaki, M. (1978). Two trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs: their distributions in fresh and sea water areas in the central northern Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24: 59-88.
- 横田明穂 (1990). 光合成CO₂固定酵素, RuBisCO, の in vivo 機能形態と光呼吸の機構. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 64: 129-137.